



L'antisynapse, un complexe de signalisation transitoire situé aux antipodes de la synapse immunologique

Chloé Guedj

► To cite this version:

Chloé Guedj. L'antisynapse, un complexe de signalisation transitoire situé aux antipodes de la synapse immunologique. Immunologie. Université René Descartes - Paris V, 2014. Français. NNT : 2014PA05T018 . tel-01196003

HAL Id: tel-01196003

<https://theses.hal.science/tel-01196003>

Submitted on 8 Sep 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UFR Sciences du vivant
Bâtiment Lamarck
35, rue Hélène Brion
75205 PARIS CEDEX 13

Institut Cochin
Département Immunologie et Hématologie
CNRS UMR8104, INSERM U1016
Université Paris V – Descartes
22, rue Méchain
75014 paris

THÈSE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ PARIS V – RENÉ DESCARTES

Ecole doctorale – Biochimie, Biothérapies, Biologie Moléculaire et Infectiologie

Spécialité : Immunologie

Présentée par Mlle Chloé Guedj

Pour l'obtention du titre de Docteur de l'université de Paris V - René Descartes

**L'antisynapse, un complexe de signalisation transitoire
situé aux antipodes de la synapse immunologique**

Soutenue le 4 juillet 2014, devant le jury composé de :

Dr Claire Hivroz	Présidente
Dr Salvatore Valitutti	Rapporteur
Dr Annemarie Lellouch	Rapporteur
Dr Maria Isabel Thoulouze	Examinatrice
Dr Philippe Bousso	Examineur
Dr Clotilde Randriamampita	Directrice de thèse

RÉSUMÉ

Lors d'une réponse immune, les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) interagissent entre elles. La synapse immunologique (SI), interface de contact entre les deux cellules, est le site où une cascade de signalisation se met en place. Les lymphocytes T subissent alors un profond réarrangement au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme : les protéines impliquées dans cette signalisation sont alors recrutées à la synapse immunologique.

Nous nous intéressons à une nouvelle structure appelée "l'antisynapse" qui se localise au pôle opposé à celui de la synapse immunologique. L'objectif de notre étude est de déterminer la composition de cette nouvelle structure et sa cinétique d'apparition et de disparition.

Afin d'étudier cette structure, nous faisons des conjugués *in vitro* entre des CPA et des lymphocytes T et nous observons la formation de ces contacts sur cellules vivantes ou cellules fixés. L'antisynapse est composée de molécules de signalisations que l'on retrouve classiquement à la synapse immunologique, tels que LAT, CD3, Lck ou la PI3K. Grâce à la sonde fluorescente ROZA récemment développée au laboratoire¹, nous avons montré que la kinase ZAP-70 est activée à l'antisynapse. Ces observations sont cohérentes avec le fait que nous avons déjà observé la présence de protéines avec des tyrosines phosphorylées à ce pôle. Cette structure précoce et transitoire s'observe fréquemment et apparaît très souvent avant que la synapse ne puisse être détectée. Son apparition est indépendante de la signalisation en aval du TCR et peut être déclenchée par un signal d'adhésion. D'autre part, le cytosquelette de microtubules semble jouer un rôle majeur dans sa disparition.

Le rôle de l'antisynapse est toujours en cours d'étude mais nous avons déjà pu montrer qu'elle constituait un point de stockage pour les protéines destinées à former la synapse immunologique au moment de sa formation.

Grâce à cette structure nous essayons de mieux comprendre comment le signalosome s'assemble dans la cellule T. Nous voulons également comprendre comment une telle structure peut apparaître aussi rapidement et quelles sont les voies de signalisation mises en jeu dans sa formation.

¹Randriamampita et al (2008) PloS One 3: e152

ABSTRACT

During the immune response, T lymphocytes and antigen presenting cells (APC) are known to develop strong interactions. The immunological synapse (IS), structure established at the interface between the two cells, is the site where a cascade of signaling events is initiated and may lead to a physiological response. T lymphocyte undergoes a profound rearrangement in the plasma membrane and in the cytoplasm: proteins which are involved in the signaling are recruited to the immunological synapse.

We have recently described a new structure that we have called antisynapse (ASI), located at the cell pole opposite to the synapse¹. The purpose of this work is to characterize the components of this new structure and their kinetic of appearance and disappearance.

To study this structure, we made *in vitro* contact between APC and T lymphocytes and we observed these conjugates either in live or fixed conditions.

Surprisingly, the antisynapse contains most of the signaling molecules classically reported as components of the immunological synapse such as LAT, CD3, Lck or PI3K. By using the fluorescent probe ROZA that we recently developed¹, we have shown that ZAP-70 is activated at the antisynapse. This observation is consistent with the fact that we have also observed the presence of tyrosine-phosphorylated proteins at the ASI. Interestingly, we have observed that LFA-1, a protein involved in the adherence, is also found at the ASI.

Our results indicate that this transient structure develops frequently and appears rapidly after the contact between the T cell (around one minute) and the APC. Surprisingly, antisynapse formation is independent on TCR signaling but is triggered by adhesion. Furthermore, it disappears using the microtubule network.

The role of the antisynapse is currently under investigation but we have shown that it constitutes a stock of proteins ready to go to the forming immune synapse.

We currently try to take advantage of this structure to better understand how the T cell signalosome may assemble and to find out if, functionally, the T cell takes advantage of this structure. We also try to understand how this paradoxical structure can appear so rapidly and what are the signaling pathways involved in its establishment.

¹Randriamampita et al (2008) PloS One 3: e152

TABLE DES MATIÈRES

Résumé	3
Abstract	5
Table des figures et encarts	10
Liste des abréviations	12
Introduction	15
Avant propos	17
I. Les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes sont des acteurs cellulaires de la reconnaissance de l'antigène	18
1. <i>Les cellules présentatrices d'antigènes</i>	18
A. Les cellules dendritiques	19
B. Les macrophages	19
C. Les lymphocytes B	20
2. <i>Les lymphocytes T</i>	21
3. <i>Les organes lymphoïdes secondaires fournissent des lieux de rencontre entre les CPA et les LT</i>	22
4. <i>Dynamique des lymphocytes T dans les organes lymphoïdes secondaires</i>	24
A. Qu'est-ce que la polarité cellulaire ?	24
B. Dynamique des interactions entre les LT et les CPA	25
C. Quels sont les mécanismes qui permettent aux cellules T de se déplacer ou s'arrêter	27
II. La signalisation induite par les contacts entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes	32
1. <i>Le signal du TCR</i>	32
A. Initiation de la signalisation et seuil d'activation	32
B. La voie calcique	36
C. La voie NFkB	39
D. La voie MAP Kinases	39
2. <i>La Co-stimulation par CD28</i>	41
3. <i>La co-stimulation par les intégrines</i>	43
A. L'intégrine LFA-1 peut moduler son affinité.	43
B. Les voies de signalisation reliées à LFA-1	44
C. Effet des intégrines sur l'activation et l'activité effectrice des cellules T	48
4. <i>Terminaison du signal par des protéines inhibitrices</i>	49
A. CTLA-4	49
B. PD-1	51
5. <i>Signaux sans antigènes spécifiques</i>	51
III. Caractéristiques morphologiques des interactions entre LT et CPA	53
1. <i>Découverte et propriétés des interactions entre LT et CPA</i>	53
2. <i>Architecture des synapses immunologiques et destins cellulaires</i>	56
A. La synapse monocentrique mature	57
B. La synapse multifocale	62

C. La synapse dynamique ou kinapse	68
D. Conclusions	72
IV. La Polarisation des cytosquelettes et le trafic intracellulaire lors de la formation de la synapse immunologique	73
1. Réorganisation du cytosquelette d'actine en réponse à un signal TCR	73
A. Polymérisation dépendante du complexe Arp2/3	73
B. Polymérisation indépendante du complexe Arp2/3	75
C. Le cytosquelette d'actine et la signalisation dans les LT	76
D. Le cytosquelette d'actine joue un rôle dans la dégranulation	77
2. Polarisation du cytosquelette de microtubules et du centrosome	77
A. Régulation	78
B. Quels sont les effets de la polarisation des microtubules et du MTOC ?	82
3. Trafic vésiculaire à la synapse immunologique	85
A. Le recyclage des endosomes est nécessaire pour le regroupement des TCR et la formation de la SI	85
B. Régulation du recyclage des endosomes	87
C. La synapse immunologique : un cil primaire « frustré »	88
V. L'antisynapse, une pré-synapse au pôle opposé à celui de la synapse	91
1. Localisations paradoxales de protéines de signalisation dans les lymphocytes T	91
A. Le cap	91
B. Le Distal Pole Complex	92
C. La synapse distale	93
2. Découverte de l'antisynapse	94
Résultats	97
I. Résultats sur l'antisynapse	99
1. Accumulation de protéines de signalisation à l'antisynapse	99
2. La cinétique de l'anti synapse	102
3. Quel est le destin des protéines à l'antisynapse ?	103
4. La disparition de l'antisynapse a lieu en même temps que la relocalisation du MTOC.	105
5. Qu'est ce qui contrôle la formation de l'antisynapse ?	106
6. Le déclenchement de la formation de l'antisynapse est indépendant de la signalisation du TCR.	108
7. La formation de l'antisynapse est déclenchée par l'adhésion	110
II. Résultats sur Dlg1 et la synapse immunologique	113
1. Avant propos	113
2. Dlg1 est impliqué dans la relocalisation du MTOC dans les cellules T	114
3. Conclusion	115
Discussion	117
1. L'antisynapse, une pré-synapse à l'opposé de la synapse immunologique.	119
2. Régulation de cette structure	121
1. Comment un signal d'adhésion à la synapse immunologique peut-il provoquer un recrutement de protéines à l'opposé de la synapse immunologique ?	121
2. Par quelles voies les protéines atteignent l'antisynapse ?	123
3. Quels sont les signaux qui entraînent la disparition de l'antisynapse ?	124

4. Quel est le destin des protéines qui quittent l'antisynapse ?	124
5. Par quelles voies les protéines vont de l'antisynapse à la synapse ?	125
3. <i>Avantages conférés par l'antisynapse aux cellules T</i>	125
1. Contribution au mouvement du MTOC	125
2. L'Assemblage d'un pré-signalosome destiné à la synapse immunologique	126
4. <i>Conclusion générale</i>	128
Matériels et méthodes	131
1. <i>Culture cellulaire</i>	133
2. <i>Souris</i>	133
3. <i>Anticorps et produits</i>	133
4. <i>Constructions</i>	134
5. <i>Transfection</i>	134
6. <i>Formation des conjugués</i>	134
7. <i>Tranches de ganglions lymphatiques</i>	135
8. <i>Les marquages en immunofluorescence</i>	135
9. <i>Cytométrie en flux</i>	136
10. <i>Mesure de Calcium par spectrofluorimétrie</i>	136
11. <i>Imagerie</i>	136
12. <i>Statistiques</i>	137
13. <i>Détermination des antisynapses</i>	137
Bibliographie	139
Annexes	173
I. Article 1 (en cours de soumission) : T cell adhesion to antigen-presenting cells triggers the formation of the antisynapse, a signaling pole opposite the immune synapse.	174
II. Article 2 (publié) : The scaffolding protein Dlg1 is a negative regulator of cell-free virus infectivity but not of cell-to-cell HIV-1 transmission in T cells	211

TABLE DES FIGURES ET ENCARTS

FIGURES

INTRODUCTION

Figure 1: Les différentes sous-populations de LT CD4+	22
Figure 2: Architecture du ganglion et entrée des CD et des LT	23
Figure 3: Mécanisme d'entrée des LT dans les organes lymphoïdes secondaires	28
Figure 4: Mécanisme de la formation de l'uropode dans les LT	30
Figure 5: Différents modèles pour expliquer le déclenchement de la signalisation du TCR.	34
Figure 6: Illustration du signal calcique induit par la PLC γ_1 et de l'interaction STIM1 et Orai1	38
Figure 7: Représentation schématique de la signalisation TCR/CD28 dans les lymphocytes T.....	40
Figure 8: Effet de CD28 sur la cascade du TCR.....	43
Figure 9: Les trois conformations de LFA-1.....	44
Figure 10: Régulation du signal <i>inside out</i> en réponse à une stimulation TCR.	46
Figure 11: Passage de la conformation dépliée fermée à dépliée ouverte de LFA-1.....	47
Figure 12: Conditions d'observation <i>in vitro</i> des différentes synapses.	56
Figure 13: Structure et cinétique de la synapse monocentrique mature	58
Figure 14: Organisation de la synapse sécrétrice entre un CTL et sa cible.....	59
Figure 15: Organisation de la synapse multifocale	64
Figure 16: L'activation des cellules T est initiée par des structures dynamiques composées de nanoclusters de signalisation	67
Figure 17: Synapse dynamique ou kinapse.....	69
Figure 18: Synapses et destins cellulaires.....	72
Figure 19: Les acteurs de la polymérisation de l'actine	75
Figure 20: Mécanismes moléculaires de la relocalisation du MTOC	81
Figure 21: Rôle des microtubules au niveau de la synapse	83
Figure 22: Trafic vésiculaire à la SI	88
Figure 23: Comparaison du cil primaire et de la synapse immunologique	90
Figure 24: Interaction entre STIM1 et Orai1 au <i>puncta</i> et au <i>cap</i>	91
Figure 25: Le <i>Distal pole complex</i>	93
Figure 26: Distribution de la PKC- θ à la synapse distale dans des T _{REG}	94
Figure 27: Activité de ROZA à la synapse et à l'antisynapse	94
Figure 28: Composition de l'antisynapse.....	95

RÉSULTATS

Figure 29: Composition de l'antisynapse.....	100
Figure 30: Composition de l'antisynapse (suite).....	101
Figure 31: Cinétique de l'antisynapse	103
Figure 32: L'antisynapse disparaît au profit de la synapse	104

Figure 33: La disparition de l'antisynapse est corrélée avec la relocalisation du MTOC.....	105
Figure 34: Rôle du cytosquelette d'actine sur la formation de l'antisynapse.....	107
Figure 35: Les voies de signalisation impliquées dans la formation de l'antisynapse	108
Figure 36: Régulation de la formation de l'antisynapse.....	109
Figure 37: Caractérisation des cellules JRT3 et J31.13	110
Figure 38: Une inhibition de l'expression de Dlg1 affecte la relocalisation du MTOC.....	115

DISCUSSION

Figure 39: Exemples d'antisynapses relevés dans la littérature.....	120
Figure 40: Schéma récapitulatif de la régulation de l'antisynapse	129

ENCARTS

INTRODUCTION

Encart n° 1: Les radeaux lipidiques.....	36
Encart n° 2: Les différentes synapses	55
Encart n° 3: La microscopie par TIRF (<i>Total Internal Reflection fluorescence Microscopy</i>)	60
Encart n° 4: La microscopie à haute résolution : Le STORM (<i>stochastic optical reconstruction microscopy</i>) et le PALM (<i>photo-activated localization microscopy</i>)	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AP-1	Activator Protein-1
aPKC	PKC atypique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
Arp 2/3	Actin-related protein-2/3
ASI	Antisynapse
BCR	B cell receptor
CD	Cluster of différenciation
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'antigène
CRAC	Calcium Release Activated calcium Chanel
Csk	C-terminal Src Kinase
CTLA-4	Cytotoxic T lymphocyte associated protein-4
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
DAG 1,2	Diacylglycerol
DC	Cellule Dendritique
DIA-1	Diaphanous-1
Dlg	Discs large
Erk	Extra-cellular signal-Regulated protein Kinases
ERM	Ezrine-Radixine-Moésine
EZH2	Enhancer of zeste homologue-2
FMNL1	Formin-like-1
Foxp3	Forkhead box P3
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
GAP	GTPase-activating proteins
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green fluorescent protein
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
GSK3	Glycogene synthase kinase 3
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
HDAC6	Histone Deacetylase 6
HEV	Veinule à endothélium épais
HLA	Human leukocyte antigen
HS1	Haematopoietic-cell-specific protein-1
Ig	Immunoglobuline
Ikk	IκB kinase
IκB	Inhibitor of κB
IL	Interleukine
IP3	Inositol 1,4,5 trisphosphate
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif
JNK	c-Jun NH2-terminal Kinases
LAT	Linker for Activation of T cells
LB	Lymphocyte B
Lck	Lymphocyte Cell-specific tyrosine Kinase
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen-1
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Lymphocyte T
LTreg	Lymphocyte T régulateur
LT _H	Lymphocyte T helper
MAP Kinases	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen-activated or extracellular signal-regulated protein kinase
mDC	DC myéloïdes
MTOC	Microtubule organizing center (centre organisateur des microtubules)

NFAT	Nuclear Factor of activated T cells
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NK	Natural Killer
nPKC	Nouvelle PKC
Par3	Partitioning defective 3
PBT	Peripheral Blood T cell
pCMH	CMH associé à un peptide
pDC	DC plasmocytoïdes
PDK1	Phosphoinositide-dependent protein kinase 1
PH	Pleckstrin Homology
PI3K	Phosphatidylinositol-3-OH kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol -4,5-biphosphate
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKC	Protéine Kinase C
PLC-γ1	Phospholipase Cγ1
RasGRP	Ras Guanyl nucleotide-releasing protein
RE	Réticulum endoplasmique
ROZA	Reporter of ZAP-70 activity
SAg	Super-antigène
SH2	Src homology 2
SI	Synapse immunologique
SLP-76	SH2-domain-containing leucocyte protein of 76 kDa
SMAC	Supra molecular activation cluster
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Accessory Protein Receptors
TCR	T Cell Receptor
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Ti-Treg	TGF-β induced Treg
TLR	Toll like receptor
VAMP	Vesicle Associated Membrane Protein
WASP	Wiskott–Aldrich syndrome protein
ZAP-70	Zeta-chain-associated protein kinase 70

INTRODUCTION

AVANT PROPOS

Le système immunitaire est un ensemble d'organes, de cellules et de molécules qui assure la protection de l'organisme contre les dommages qu'il peut subir. Son efficacité réside dans sa capacité à reconnaître un déséquilibre comme l'entrée d'un pathogène dans l'organisme ou le développement d'une tumeur. Il mobilise aussi un ensemble d'acteurs qui, par leurs rôles effecteurs peuvent éliminer la source du danger. Il peut aussi générer une mémoire qui assurera une protection durable à l'organisme contre une menace déjà rencontrée.

Ce système fait face aux signaux de danger grâce à des réponses à deux vitesses. La mise en place de la réponse dite innée se fait en quelques heures et peut aboutir à l'élimination du danger. Cette réponse met en jeu des cellules résidentes dans les tissus qui peuvent détecter un large champ de motifs habituellement retrouvés à la surface de pathogènes. Quand la résolution de l'infection n'est pas complète avec cette première réponse, une seconde dite adaptative peut se mettre en place en quelques jours et mobiliser un ensemble d'acteurs qui vont s'activer et proliférer après avoir reçu des signaux.

Habituellement décrit de cette manière, la dualité de ce système doit cependant être repensée à la lumière des données les plus récentes. Il est en effet difficile de classer catégoriquement des cellules ou des molécules comme appartenant à la réponse innée ou adaptative. Les activités de ces acteurs dépendent en fait de l'établissement d'un réseau de connexions. Certains types cellulaires et molécules se retrouvent ainsi à l'interface entre ces deux réponses.

Pour certaines classes d'agents pathogènes, l'élimination par les cellules situées au premier front de défense, derrière les barrières naturelles de l'organisme, n'est pas assez efficace. Dans ce cas, des cellules agissant comme des sentinelles, les cellules présentatrices d'antigènes, peuvent, grâce à la détection d'une situation de danger mobiliser d'autres acteurs cellulaires, les lymphocytes T.

Les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes sont initialement séparés après leur différenciation. La probabilité pour qu'ils se rencontrent à l'échelle de la cellule, dans un espace aussi immense que celui d'un organisme multicellulaire, est proche de zéro. Les organes lymphoïdes secondaires, qui fournissent un environnement spécialisé, promouvant la rencontre entre ces deux types cellulaires dans des zones définies, permettent d'augmenter considérablement cette possibilité. Dans ces compartiments, une multitude de participants (dont les cellules immunes) avec des intérêts communs (échanges d'information) interagissent les uns avec les autres par l'intermédiaire de contacts directs.

Les formes que peuvent prendre les interactions, qui surviennent entre les lymphocytes T et les cellules présentatrices, seront décrites dans le chapitre III et IV. Mais avant cela je décrirai brièvement ces deux classes de cellules ainsi que l'organisation des ganglions lymphatiques. J'aborderai également dans le chapitre II, l'ensemble des événements moléculaires qui surviennent dans les lymphocytes T lors de ces contacts.

I. LES LYMPHOCYTES T ET LES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES SONT DES ACTEURS CELLULAIRES DE LA RECONNAISSANCE DE L'ANTIGÈNE

Les cellules présentatrices d'antigènes et les lymphocytes T se rencontrent dans les organes lymphoïdes afin de mettre en place ensemble une réponse immunitaire. Je décrirai d'abord ces deux types de cellules avant de présenter brièvement l'organisation des organes lymphoïdes secondaires. Le comportement des lymphocytes T et la dynamique des contacts dans ces organes seront abordés dans une dernière partie.

1. LES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES

La présentation des antigènes est un processus qui permet aux cellules d'exprimer à leur surface des petits peptides associés à un récepteur, le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Il existe deux familles de CMH, celle de classe I et de classe II. Les CMH sont polygéniques, c'est à dire qu'ils sont codés par un ensemble de gènes hérités des deux parents, et polymorphes, c'est à dire qu'il existe des variantes au sein de chaque gène. Ces propriétés font que chaque individu possède un ensemble de CMH unique.

Après avoir été internalisés, les antigènes sont apprêtés. C'est à dire qu'ils sont dégradés en petits peptides qui peuvent ensuite être chargés dans le sillon des CMH. Les antigènes issus du cytoplasme (dits endogènes) sont chargés sur le CMH-I alors que ceux qui proviennent du milieu extracellulaire (dits exogènes) sont chargés sur le CMH-II. Il existe aussi une troisième voie, dite croisée, qui permet le chargement d'antigènes exogènes sur le CMH-I. Les CMH sont ensuite exportés à la surface de la membrane.

Comme la plus grande majorité des cellules de l'organisme expriment le CMH-I, nous pouvons considérer mot pour mot que ces cellules sont toutes des cellules présentatrices d'antigènes.

Seules quelques cellules expriment en revanche le CMH-II. Parmi elles : les cellules dendritiques, les lymphocytes B et les macrophages. L'expression du CMH-II, du CMH-I ainsi que des molécules de co-stimulations dont les effets seront abordés dans le chapitre II.2 confèrent un avantage unique à ces cellules: celui de pouvoir activer les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Ces cellules sont regroupées sous le terme de cellules présentatrices d'antigènes professionnelles.

Les cellules dendritiques sont les cellules présentatrices d'antigènes les plus efficaces pour l'activation des lymphocytes T, d'une part car elles contribuent activement au transfert d'antigènes, d'un foyer infectieux au tissu lymphoïde le plus proche mais aussi parce que ces cellules possèdent une panoplie très large de molécules de surface (CMH-I, CMH-II, molécules d'adhésion, molécules de costimulation, molécules permettant la capture d'antigènes). De plus, elles possèdent le même récepteur aux chimiokines, CCR7, que les lymphocytes T naïfs ce qui leur permet de se localiser dans les mêmes zones que ces derniers, dans les organes lymphoïdes.

A. LES CELLULES DENDRITIQUES

Ces cellules sont générées dans la moelle osseuse et se différencient à partir de deux types de progéniteurs : un progéniteur myéloïde ou un progéniteur lymphoïde. Il existe deux classes de cellules dendritiques : les cellules dendritiques conventionnelles (CDc) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp).

Les CDp ne font pas de longues projections (les dendrites) comme les CDc, ont une durée de vie longue et peuvent circuler dans l'organisme. Après une stimulation virale, elles produisent une grande quantité d'interféron de type I. Ces cellules appréhendent peu efficacement les antigènes et expriment peu de CMH-II et de molécules co-stimulatrices à leur surface. Elles sont, pour ces raisons, moins efficaces pour stimuler les LT naïfs que les CDc.

Les CDc (dont je ferai uniquement référence par la suite en parlant de CD) sont retrouvées au niveau des épithéliums de surface, dans les organes lymphoïdes secondaires mais également dans certains organes non lymphoïdes. A l'état immature, leur niveau d'expression des molécules de co-stimulation et de CMH est très bas et elles ont la capacité de capturer activement les particules de leur environnement par phagocytose. Elles peuvent de cette façon collecter des antigènes à partir de pathogènes phagocytés. Si elles sont la cible de certains virus, elles peuvent également capter les antigènes à partir des protéines virales produites dans leur cytoplasme. Les antigènes sont ensuite exprimés sur leur CMH-I ou II selon leur origine. Cette étape va conditionner le type de lymphocyte T avec qui elles pourront interagir. Les cellules CD8⁺ peuvent reconnaître uniquement les peptides présentés par les CMH-I tandis que les lymphocytes T CD4⁺ peuvent reconnaître ceux présentés par les CMH-II.

Une fois que les cellules dendritiques ont capturé un antigène et activé leurs motifs de reconnaissance des signaux de danger, elles subissent alors un processus de maturation au cours duquel elles changent de forme pour s'arrondir et passer dans la circulation afin d'atteindre le tissu lymphoïde le plus proche. Les cellules dendritiques qui résident dans les organes lymphoïdes peuvent capter les antigènes solubles sur place grâce au drainage des tissus par la circulation lymphatique.

Lors du processus de maturation, en plus d'exprimer à leur surface des CMH-I et CMH-II chargés en antigènes, les CD se mettent à exprimer des molécules dites de co-stimulation comme CD80 et CD86 mais aussi des chimiokines et des cytokines. Elles perdent également leur capacité de phagocytose.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, après avoir mûri, les CD peuvent présenter leurs antigènes aux lymphocytes T. Les cytokines présentes dans ces organes permettent aux CD d'optimiser leur rencontre avec les lymphocytes T en augmentant considérablement leur surface de contact grâce à de longues projections membranaires, les dendrites (Revue: Boltjes and van Wijk, 2014).

B. LES MACROPHAGES

Comme les CD, ces cellules peuvent augmenter l'expression du CMH-II et des molécules de co-stimulations grâce à l'activation de leurs récepteurs de danger. Dans les ganglions, ils se situent dans le sinus marginal au contact avec l'arrivée de la lymphe afférente. De cette façon, ils sont en première ligne

pour collecter les antigènes solubles qui prennent cette voie. Ces cellules ont la plus grande capacité de phagocytose. Elles peuvent ainsi capter une grande variété d'antigènes, les apprêter et les présenter sur leur CMH.

Ces cellules n'ont pas la capacité de migration entre les tissus périphériques et les organes lymphoïdes secondaires. Dans les tissus, leurs fonctions majeures sont centrées sur l'élimination des cellules mortes et le renforcement des activités effectrices des cellules T activées recrutés sur place. Il est important de noter que les macrophages exercent des fonctions au delà du système immunitaire. Ils ont aussi un rôle fondamental dans le développement et les processus de cicatrisation par exemple. (Revue : Hume, 2008)

C. LES LYMPHOCYTES B

Les lymphocytes B (LB) proviennent du même progéniteur commun que les lymphocytes T. Ils se développent dans la moelle osseuse où leur récepteur, le BCR (récepteur des cellules B) est généré. Durant cette phase, le gène du BCR subit, comme pour le récepteur des cellules T, le TCR, une recombinaison aléatoire de ses segments. Cette étape aboutit à la génération d'un répertoire de cellules B, riche de quelques milliards de cellules qui possèdent toute une spécificité unique au niveau de leur BCR.

Les LB ont alors l'avantage de capter des antigènes par la reconnaissance de motifs spécifiques sur les antigènes solubles alors que les CD et les macrophages ne peuvent reconnaître que des motifs communs à de nombreux pathogènes. La capture des antigènes par les LB se fait soit directement grâce à leur diffusion dans la lymphe et leur arrivée par le sinus sous-capsulaire ou par l'intermédiaire des macrophages, des cellules dendritiques et des cellules dendritiques folliculaires qui résident dans les organes lymphoïdes secondaires. Ces cellules peuvent retenir les antigènes intacts à leur surface mais peuvent aussi les restituer aux LB après leur internalisation et leur passage par des voies intracellulaires non dégradatives.

La liaison de l'antigène au BCR entraîne son internalisation. Celui passe ensuite par les voies classiques d'apprêtement et de présentation du CMH-II. Les LB expriment alors à ce moment là les molécules de co-stimulation CD80 et CD86.

Les LB sont au cœur de la réponse adaptative humorale. Leur BCR suite à la différenciation du LB en plasmocyte, peut passer d'une forme membranaire à une forme sécrétée (anticorps). Les anticorps exercent leurs fonctions, en se liant aux antigènes solubles comme les toxines ou les virus, empêchant ainsi par compétition leur liaison à leurs récepteurs et inhibant les effets que ces liaisons peuvent entraîner. Ils permettent aussi d'activer la voie du complément (ensemble de protéines plasmatiques qui forment des pores dans les membranes) et d'activer les voies de phagocytose en se liant par leur partie invariable à des récepteurs de cellules phagocytaires. (Revue : Avalos and Ploegh, 2014, Batista and Harwood, 2009).

En conclusion, les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles constituent une classe de partenaires privilégiée pour les cellules T dans les organes lymphoïdes secondaires.

2. LES LYMPHOCYTES T

Les lymphocytes T (LT) se développent dans la moelle osseuse et dérivent de la lignée lymphoïde. Après leur différenciation, les lymphocytes T immatures migrent dans le thymus où ils finissent leur maturation.

Dans cet organe, leur récepteur, le TCR (récepteur des cellules T) subit une recombinaison aléatoire de ses séquences, et va être testé pour sa réactivité avec le CMH. A l'issue d'une étape de sélection positive puis négative, les cellules T matures naïves quittent le thymus pour rejoindre la circulation périphérique.

Étant donnée l'immense diversité de TCR générée, la population des cellules T naïves périphériques forme un large répertoire dont le potentiel sera exploité lors de la mise en place d'une réponse immune.

Parmi cette population, il existe deux types de LT, ceux porteurs d'un TCR $\alpha:\beta$ et ceux porteurs d'un TCR $\gamma:\delta$.

Le TCR $\alpha:\beta$ est un hétérodimère de deux chaînes, α et β , qui assemblées peuvent reconnaître un antigène spécifique dans le contexte d'une présentation par le CMH. Dans la suite de ce manuscrit, je ne ferais allusion qu'aux cellules T porteuses d'un TCR $\alpha:\beta$.

Il est important de noter qu'il existe une autre famille de récepteurs TCR, qui sont composés d'une chaîne γ et δ . Leur rôle est encore en cours d'étude mais des caractéristiques notables ont cependant été relevées pour les cellules porteuses d'un TCR $\gamma:\delta$. Selon la sous-population à laquelle elles appartiennent, leur activation peut se faire directement sur le lieu de l'infection et leur TCR a la capacité de reconnaître l'antigène directement (revue : Vantourout and Hayday, 2013).

La structure du TCR $\alpha:\beta$ et ses protéines associées seront décrites dans le chapitre II.1.A.

Il existe deux groupes de cellules T $\alpha:\beta$: celles qui portent le co-récepteur CD4⁺ et celles qui portent le co-récepteur CD8⁺.

Les lymphocytes T CD8⁺ se différencient en lymphocytes T cytotoxiques ou CTL (*cytotoxic T cells*) après avoir été activés. Leur action effectrice repose sur l'élimination de leur cible par la libération de vésicules chargées en molécules cytotoxiques mais aussi par la sécrétion de cytokines comme l'interféron γ . Les CTL ont la particularité d'être activés en deux étapes. Une première étape, en réponse à une faible concentration en antigènes ainsi que des signaux de co-stimulations, permet de rendre les cellules T CD8⁺ naïves, cytotoxiques, c'est à dire capable d'induire la mort de leur cellule cible. Une seconde étape en réponse à une concentration en antigènes plus forte permet d'activer complètement les CTL et d'induire leur prolifération (Valitutti et al., 1996). Des LT CD8⁺ avec un rôle régulateur ont également été caractérisés dans des souris (Bienvenu et al., 2005).

Les lymphocytes T CD4⁺, peuvent se différencier en plusieurs types de cellules effectrices après avoir été activés. Leur différenciation est dirigée par le cocktail cytokinique émis par les CPA qui les activent dans les organes lymphoïdes secondaires. Il existe de nombreuses sous-populations de cellules CD4⁺. Elles sont

classées selon leurs marqueurs de surface, leurs facteurs de transcription et les cytokines qu'elles produisent. Une partie de ces sous-populations sera décrite dans la Figure 1.

Les T_H1 , T_H2 , T_H17 et T_H22 ont un rôle activateur sur leurs cellules cibles. Ils amplifient les réponses en amplifiant les effets des autres effecteurs (macrophages, LB, neutrophiles...). Les deux sous-populations de $T\ CD4^+$ régulatrices : les T_{Reg} et les T_R1 sont différenciées par la présence du facteur de transcription FOXP3. Ces deux classes ont une fonction suppressive sur l'activité des autres LT. Elles sont importantes dans le contrôle de la réponse immune et dans la prévention des réponses auto-immunes. (Revue: François Bach, 2003; Murphy and Reiner, 2002; Zúñiga et al., 2013)

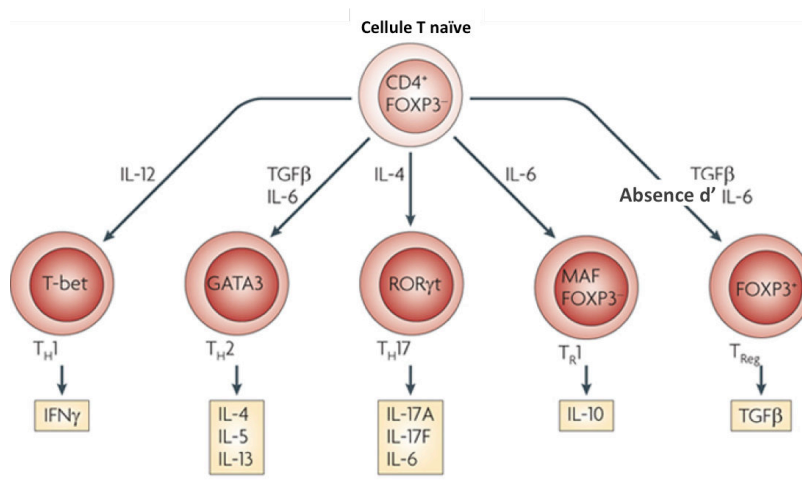


Figure 1: Les différentes sous-populations de LT $CD4^+$

Les cellules $CD4^+$ naïves se différencient en réponse à des signaux cytokiniques émis par les CPA. Chaque population de cellules T activées produit à son tour des cytokines caractéristiques de son profil en réponse à des facteurs de transcription spécifiques. Ces cytokines vont conditionner leur rôle effecteur. Extrait de (Hooper and Macpherson, 2010).

3. LES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES FOURNISSENT DES LIEUX DE RENCONTRE ENTRE LES CPA ET LES LT

Il existe trois classes d'organes lymphoïdes : les organes lymphoïdes primaires avec la moelle osseuse et le thymus et les organes lymphoïdes secondaires avec la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Des organes lymphoïdes tertiaires, constitués de zones similaires à celles retrouvées dans les organes lymphoïdes secondaires, peuvent aussi apparaître après la naissance. Ces structures se forment dans certains contextes inflammatoires chroniques.

Les organes lymphoïdes secondaires jouent un rôle dans l'activation, la différenciation et la prolifération des LT. Pour être activés, les LT doivent rencontrer, en ce lieu, une cellule présentatrice qui porte à sa surface des antigènes pour lesquels leur TCR est spécifique.

Ces organes sont très nombreux, perpétuellement 'visités' par des cellules non résidentes et approvisionnés en molécules solubles, grâce à deux systèmes circulatoires, le système sanguin et lymphatique.

Le système lymphatique draine l'ensemble des tissus de l'organisme et peut véhiculer à la fois des cellules et des molécules solubles. Il est soumis à un flux passif contrairement au flux sanguin qui est pompé par le cœur. Les cellules présentatrices d'antigènes peuvent l'emprunter et être guidées jusqu'aux ganglions grâce à un gradient de concentration de molécules aux effets chimiotactiques, les chimiokines. Les lymphocytes T font la navette entre tous ces organes lymphoïdes secondaires et peuvent y résider de quelques heures à quelques jours. On appelle ce phénomène : *homing*.

Je me focaliserai ci-dessous sur l'organisation des ganglions lymphatiques qui sont répartis dans tout l'organisme, aux points de convergence des vaisseaux du système lymphatique.

Les sinus sous-capsulaires, par lequel arrivent les cellules et les antigènes solubles *via* les vaisseaux lymphatiques afférents, entourent le ganglion lymphatique. On distingue trois zones bien distinctes à l'intérieur des ganglions, le cortex, le paracortex (zone T) et la medulla.

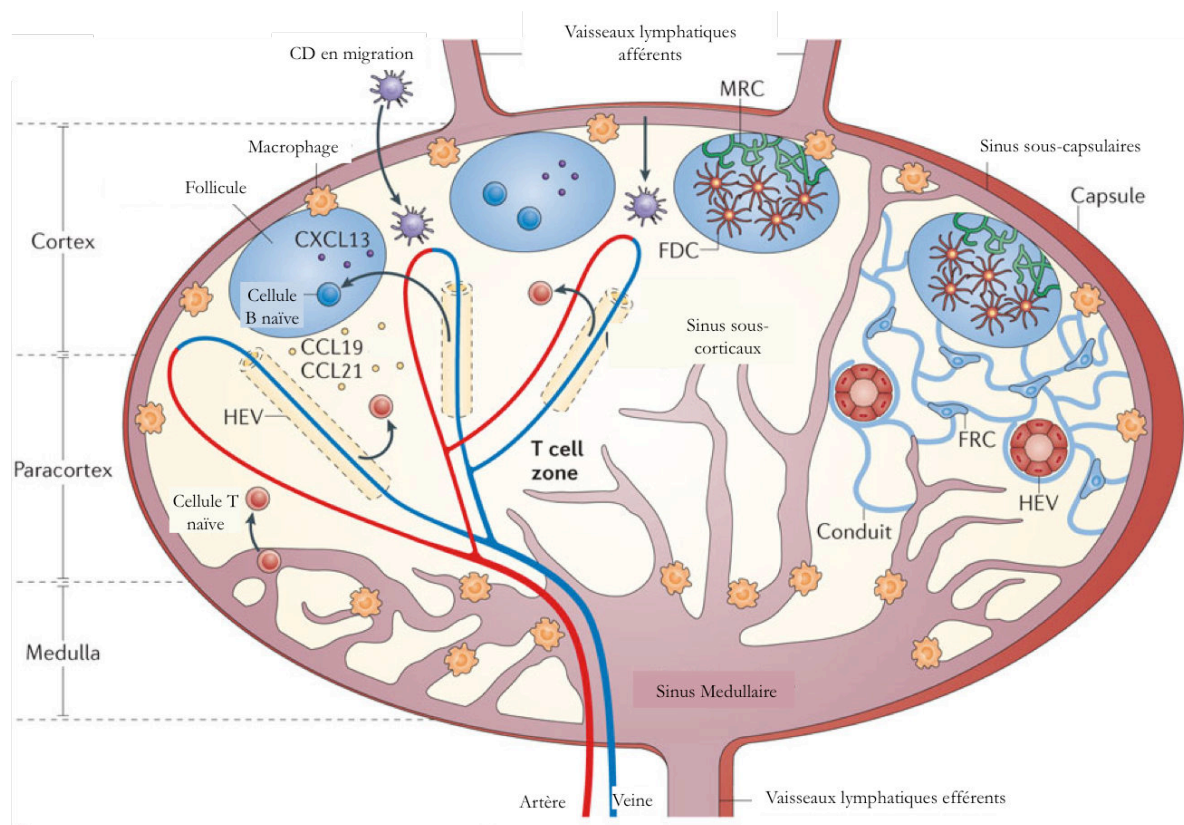


Figure 2: Architecture du ganglion et entrée des CD et des LT

Les ganglions sont divisés en trois régions principales : le cortex, le paracortex et la medulla. Les LT naïfs entrent via les HEV ou les vaisseaux lymphatiques afférents et sortent à travers les sinus corticaux, les sinus medullaires et les vaisseaux lymphatiques efférents pour atteindre la circulation lymphatique. Les CD matures arrivent grâce aux vaisseaux lymphatiques afférents. Le cortex contient les cellules B et les cellules dendritiques folliculaires (FDC)(résidentes des ganglions) regroupés dans les follicules. Les cellules réticulaires marginales (MRC) ont un rôle structural dans les follicules. Les cellules dendritiques folliculaires peuvent capter les antigènes solubles qui arrivent par les vaisseaux lymphatiques afférents et forment des réseaux denses autour desquels les cellules B se regroupent pour tester l'affinité de leur BCR. Les cellules T s'accumulent dans les zones T du paracortex. Les cellules réticulaires fibroblastiques, dans les zones T, forment des réseaux de fibres qui forment un tissu conjonctif utile au guidage des LT et des CD. Adapté de (Girard et al., 2012).

Les CD qui arrivent par les vaisseaux lymphatiques afférents sont guidées, par les chimiokines CCL19, CCL20 et CCL21 produites par les cellules qui constituent le micro-environnement des ganglions, les cellules stromales. Les lymphocytes T peuvent entrer dans les ganglions par les veinules à endothélium épais (HEV) grâce aux chimiokines sécrétées par les cellules endothéliales qui les constituent mais aussi par les voies lymphatiques afférentes.

Les lymphocytes B sont regroupés dans des follicules primaires de la zone B. En présence de stimulation antigénique, les cellules B spécifiques d'un antigène se réunissent pour former un centre germinatif. Grâce à cette structure, elles peuvent être activées, se différencier et subir une maturation de l'affinité de leur récepteur.

Les lymphocytes T sont regroupés dans le paracortex où ils sont activés. Les cellules dendritiques et les macrophages activés peuvent migrer dans cette zone pour présenter leurs antigènes aux lymphocytes T qui vont tester leur affinité du TCR.

La medulla est composée des vaisseaux lymphatiques efférents à partir desquels les lymphocytes vont quitter le ganglion. Les HEV fournissent une porte d'entrée aux lymphocytes T par la voie sanguine (Revue: von Andrian and Mempel, 2003).

La Figure 2 représente la structure d'un ganglion avec les entrées des LT et des CD.

4. DYNAMIQUE DES LYMPHOCYTES T DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES

Les lymphocytes T, au cours de leur vie, adoptent plusieurs conformations pour subvenir à leurs fonctions. Leur migration dans les organes lymphoïdes secondaires implique l'établissement d'une extrémité exploratrice qui rend la cellule mobile. Ils peuvent également perdre leur comportement migratoire pour faire des contacts stables avec des CPA. Ces phénomènes sont régis par des mécanismes de polarisations.

A. QU'EST-CE QUE LA POLARITÉ CELLULAIRE ?

Les procaryotes qui ont longtemps été considérés comme n'ayant aucune organisation interne définie montrent en réalité un haut niveau d'organisation intracellulaire. Dans ces organismes unicellulaires, des protéines qui forment des complexes stationnaires se localisent dans des régions subcellulaires précises. Des réseaux dynamiques peuvent également être formés à partir de protéines qui polymérisent entre elles. Ces réseaux cytoplasmiques bactériens sont constitués de filaments d'actines et de tubulines à partir desquels les cytosquelettes des eucaryotes ont évolué (Bornens, 2008).

Le passage à une organisation asymétrique des composants et des fonctions cellulaires est appelé la polarisation cellulaire. Cette rupture de symétrie est essentielle pour la différenciation, la prolifération et la morphogénèse des organismes unicellulaires et multicellulaires de tous les règnes du vivant.

Pour être polarisée, une cellule doit présenter une accumulation asymétrique de composants mobiles (des molécules régulatrices le plus souvent) entre des pôles opposés de la cellule et l'orientation d'un réseau filamentueux selon un axe. L'interaction entre ce réseau et les molécules régulatrices est cruciale pour l'établissement et la maintenance de la polarité cellulaire (Bornens, 2008).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, et au contact des CPA, les cellules T peuvent passer d'une morphologie à une autre en quelques secondes. Leur comportement au sein de cet environnement sera décrit dans le chapitre ci-dessous.

B. DYNAMIQUE DES INTERACTIONS ENTRE LES LT ET LES CPA

Comme décrit plus haut, les organes lymphoïdes secondaires fournissent un environnement spécialisé pour permettre aux LT d'être activés. Leur activation passe par l'établissement de contacts directs avec des CPA chargées en antigènes sur leur CMH.

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT rencontrent, au hasard, un grand nombre de CD dans la région perifolliculaire des ganglions. Deux études sur des ganglions murins explantés ont permis d'estimer le nombre de contacts que peut faire une CD avec les LT. La première, qui a été réalisée avec des CD chargées en antigènes et marquées *in vitro* puis réinjectées, suggère qu'une CD peut faire 500 contacts avec des lymphocytes T en l'espace d'une heure (Bousso and Robey, 2003). La seconde, réalisée avec des CD marquées et chargées *in vivo*, suggère qu'une CD peut faire 5000 contacts en l'espace d'une heure (Miller et al., 2004). Dans ces deux expériences, les lymphocytes T ont été marqués *in vitro* avant d'être injectés. Ces chiffres impressionnants sont tous deux compatibles avec la surface de contact maximale que peut présenter une CD dans ces organes. Ils mériteraient cependant d'être revisités dans un contexte où les deux types cellulaires observés sont endogènes pour s'affranchir des comportements que peuvent adopter ou perdre les cellules après un passage par une étape *in vitro*.

Une cellule T, spécifique pour un antigène donné, ne doit pas nécessairement faire un contact stable et long de plusieurs heures avec la même cellule pour être activée. Plusieurs études présentées ci-dessous ont montré que ces cellules établissent de nombreux contacts et peuvent accumuler des signaux d'activation à partir de toutes ces interactions.

Les mises en évidence in vitro

Une étude en 1999 a mis en évidence que les lymphocytes T naïfs faisaient des contacts transitoires avec les macrophages. La cellule T accumule alors des signaux et peut être activée après avoir migré plusieurs fois à la surface du même macrophage. Elle peut même faire des contacts avec un deuxième macrophage. Une cellule qui fait un contact continu pendant 3 heures sera aussi bien activée qu'une cellule qui fait de multiples contacts pendant 3 heures discontinues (Underhill et al., 1999).

En 2000, le comportement des lymphocytes T naïfs a été étudié non pas dans une culture liquide en deux dimensions mais dans une matrice en trois dimensions composée de fibres de collagène. Ce modèle a l'avantage de se rapprocher un peu plus du contexte physiologique de l'organe lymphoïde secondaire dans lequel le lymphocyte T naïf se trouve lors de son activation. Les auteurs de cette étude ont montré que

dans cette matrice, les cellules T migrent plus vite en présence de CPA et expriment des marqueurs précoces de l'activation. Les lymphocytes T naïfs font des contacts transitoires avec des CPA (chargées ou non en antigènes spécifiques) et peuvent se détacher de la première zone de contact pour rouler le long de la CPA à la recherche d'une autre zone (phénomène de « *crawling* »). Ils peuvent aussi se détacher de la CPA pour aller établir un contact sur une autre CPA. Un influx calcique, témoin de l'engagement du TCR avec le CMH, a même été observé dans ces cellules lors des contacts successifs. Les auteurs ont estimé que les lymphocytes T naïfs peuvent établir 10-20 contacts en 24h et devaient cumuler deux heures de contacts (non successifs) dans ce contexte pour être activés (Gunzer et al., 2000). Ces données vont à l'encontre des 20 heures de contact soutenu nécessaire pour l'activation d'une cellule T naïve (Iezzi et al., 1998). Cette première estimation avait d'ailleurs été obtenue sur des supports solides (lames de verre ou billes) recouverts de CMH alors que la plus récente utilise des CPA prenant ainsi en compte d'autres paramètres comme la dynamique de leur membrane, les récepteurs de co-stimulation qu'elles expriment et les cytokines qu'elle sécrètent, dans un espace en trois dimensions (Gunzer et al., 2000).

Mises en évidence in vivo

En 2002, une première étude utilisant la microscopie bi-photonique sur des ganglions explantés a permis de dévoiler le comportement des lymphocytes T, jusqu'à 350 µm sous la surface du ganglion, dans des zones T près des HEV. Les cellules y migrent très rapidement (jusqu'à 25 µm/min) puis ralentissent et augmentent leur vitesse de nouveau de nombreuses fois avant de s'arrêter complètement (Miller et al., 2002).

Une autre étude sur des ganglions explantés montre en revanche que les lymphocytes T forment des contacts stables et ont une vitesse très faible. Ces résultats ont été obtenus avec un microscope confocal, à partir de la zone sous-capsulaire, à 80 µm sous la surface du ganglion. Cet engagement plus long pourrait représenter l'arrêt complet décrit plus haut, lors de la mise en place de l'activation qui commencerait près des HEV quand les lymphocytes T rencontrent les CD dans la zone T (Stoll et al., 2002).

En 2004, une autre étude réalisée *in vivo* avec des données de cinétiques précises, a confirmé la survenue de ces étapes ainsi qu'une autre qui prend place plus tardivement. L'expérience a consisté à injecter ces CD fluorescentes, chargées ou non en antigènes, à des souris 18h avant l'injection de lymphocytes T naïfs fluorescents. Des collectes d'informations cinétiques ont ensuite été réalisées à partir d'images de vidéo-microscopie. Trois phases se succèdent alors, selon les auteurs, dans une fenêtre de temps supérieure à 24 heures (Stefanová et al., 2002).

- Lors des 8 heures succédant leur entrée dans le ganglion, les lymphocytes T établissent de nombreux contacts transitoires avec des CD en diminuant progressivement leur mobilité et en augmentant la présence de marqueurs de l'activation comme CD44 et CD69.
- Durant les 12 heures suivantes, les cellules forment des conjugués stables et longs et commencent à sécréter de l'IL2 et de l'IFN-γ.
- Le début de la prolifération, qui survient au deuxième jour, est synchrone avec la reprise d'une mobilité importante et des contacts transitoires.

Il est intéressant de noter que même si les CD n'ont pas été chargées en antigènes, les LT passent quand même par ces trois étapes après leur entrée dans le ganglion. La phase de contact stable est cependant plus courte. Cela indique que les lymphocytes T re-circulant suivent un itinéraire par défaut, en trois phases, quand ils passent par les organes lymphoïdes secondaires (Mempel et al., 2004). Ces interactions en présence d'antigènes du soi sont primordiales pour la reconnaissance des antigènes du non soi. Si cette étape est empêchée, les LT présentent une augmentation de leur seuil d'activation et des défauts d'activation (Stefanová et al., 2002).

Toutes ces études ont mis en évidence que les cellules T ont la capacité d'alterner entre des phases mobiles et des phases plus stables. Leur environnement permet d'induire des signaux « stop » qui favorisent leur arrêt et l'établissement d'un contact et des signaux « go » qui favorisent leur déplacement.

C. QUELS SONT LES MÉCANISMES QUI PERMETTENT AUX CELLULES T DE SE DÉPLACER OU S'ARRÊTER

Les cellules T peuvent se déplacer grâce à leur capacité d'adhérence équilibrée de façon à empêcher la cellule de se détacher de son support ou au contraire de rester fermement attachée. Leur capacité à être attirée par des molécules émises à distance de leur position initiale joue aussi un rôle dans ce mécanisme. On appelle cela, le chimiotactisme.

L'adhésion et le chimiotactisme sont impliqués dans la migration des LT vers les organes lymphoïdes secondaires mais aussi à l'intérieur lors de la recherche de l'antigène sur les CPA.

L'extravasation ou la migration des LT à travers les HEV

Pour pouvoir entrer dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT franchissent les parois des HEV. Leur mouvement sur les HEV se déroule en plusieurs étapes. Les cellules commencent par s'attacher et rouler (*rolling*) avant d'adhérer fermement avant le passage entre deux cellules endothéliales (diapédèse).

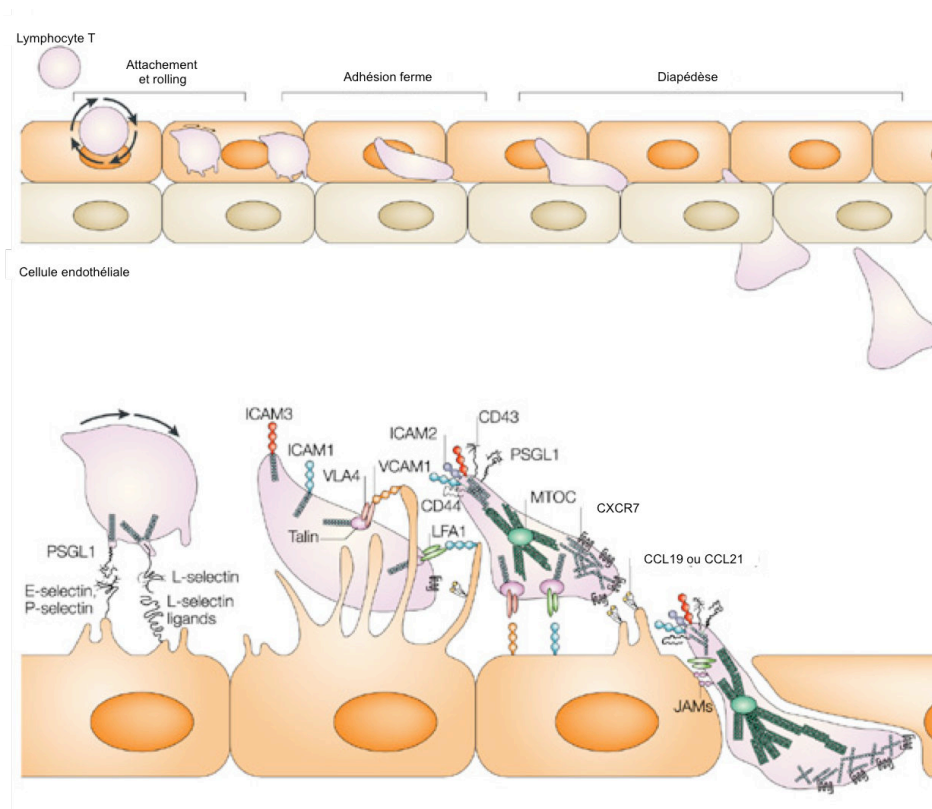


Figure 3: Mécanisme d'entrée des LT dans les organes lymphoïdes secondaires

Le schéma du haut indique les différentes étapes d'adhésion qui mènent à la transmigration. Le schéma du bas illustre l'organisation membranaire et intracellulaire lors de l'extravasation. La L-selectine et la PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), en se liant à leur ligand, permettent les premières étapes d'adhésion et de rolling. Les intégrines sont ensuite activées en réponse aux signaux chimiokines et permettent une adhésion ferme. Les chimiokines CCL19 et CCL21 sont maintenues à la surface des cellules endothéliales et interagissent avec leur récepteur CXCR7. Concernant le cytosquelette, le MTOC se positionne à l'arrière à l'uropode alors que les filaments d'actines se forment à l'avant pour former des pseudopodes. Adapté de (Vicente-Manzanares and Sánchez-Madrid, 2004).

La selectine-1 et les intégrines VLA-4 et LFA-1 sont impliquées dans ces premiers mécanismes d'adhésions et de *rolling* sur les HEV qui sont recouvertes de leur ligand. Contrairement à de nombreuses cellules mononuclées circulantes qui possèdent aussi ces protéines d'adhésion et qui circulent dans les HEV, les lymphocytes T naïfs sont équipés du récepteur aux chimiokines, CCR7. Sa liaison aux chimiokines CCL19 et CCL21, sécrétées en partie par les HEV, permet un changement de l'état d'affinité des intégrines. La cellule peut ainsi résister aux forces cisailantes du flux sanguin et migrer à la surface des vaisseaux en vue de les traverser (Revue : Barreiro et al., 2007; Stein and Nombela-Arrieta, 2005). La Figure 3 illustre ce phénomène.

Morphologie d'un LT en migration

En réponse à des signaux venant des chimiokines, les LT ont la capacité de se polariser pour adopter une forme qui leur permet de migrer. Le *leading edge*, à l'avant, composé d'un large lamellipode, est impliqué dans l'avancement de la cellule. L'arrière de la cellule, l'uropode, peut être défini comme une protrusion cellulaire dans laquelle des organelles spécifiques, des protéines du cytosquelette, d'adhésion et de signalisation sont concentrés. C'est une structure transitoire qui s'observe quand la cellule est en train de migrer sur des endothéliums ou une CPA et qui peut disparaître dans le cas où la cellule s'arrête.

complètement et établit un contact stable. La formation de l'uropode est dépendante des signaux venant des chimiokines. Une inhibition de l'activité des protéines G (avec qui les récepteurs aux chimiokines sont couplés) entraîne en effet un défaut de formation de l'uropode (del Pozo et al., 1995).

En réponse à un signal venant des chimiokines, le MTOC, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique (RE) se relocalisent à l'uropode. L'appareil de Golgi et le RE sont amenés à ce pôle grâce au MTOC à qui ils sont attachés et qui se relocalise aussi (Rios and Bornens, 2003). Les mitochondries se relocalisent à l'uropode grâce à un mécanisme dépendant des microtubules. Leur forme, influencée par des protéines qui contrôlent leur fusion ou leur fission, joue aussi un rôle primordial dans ce mécanisme (Campello et al., 2006). Bien que le MTOC représente un point d'ancrage pour les microtubules, ces derniers ne semblent pas impliqués dans la formation de l'uropode. Une étude a d'ailleurs montré qu'ils se rétractaient à l'uropode (Ratner et al., 1997). Concernant le cytosquelette d'actine, alors que l'actine se polymérise et se dépolymérise rapidement au *leading edge*, à l'uropode les filaments d'actine se réorganisent et s'alignent le long de l'axe de migration (Brown et al., 2001). Les ERM (Ezrin, Radixin et moésine) qui font le lien entre la membrane plasmique et le cytosquelette d'actine, ainsi qu'un moteur de l'actine : la myosine II, sont également retrouvés à ce pôle. La protéine MLCK (*Myosin light chain*), a été montrée comme étant importante pour la formation de l'uropode. Elle promeut l'assemblage et la contraction d'un anneau d'actomyosine au niveau de la base de l'uropode, en phosphorylant la myosine II. La contraction de cet anneau contrôle la morphologie typique de l'uropode (Kolodney and Elson, 1995).

La composition de la membrane plasmique au niveau de l'uropode et du *leading edge* diffère sensiblement. Le cholestérol et le ganglioside GM1 sont plus représentés à l'uropode alors qu'on retrouve plus le ganglioside GM3 au *leading edge* (Mañes et al., 2003). Cette différence doit probablement expliquer en partie les différences de recrutement des différentes protéines membranaires qui ont été retrouvées à ces deux pôles.

Au *leading edge*, se concentrent les récepteurs aux chimiokines qui jouent des rôles de senseurs pour une migration directionnelle des LT à travers un gradient de chimiokines. CCR2 et CCR5, deux récepteurs aux chimiokines qui reconnaissent respectivement les chimiokines CCL2 et CCL5 se relocalisent au niveau du front de migration des cellules T humaines activées traitées avec ces deux chimiokines. La relocalisation du récepteur aux chimiokines, CCR2, est d'ailleurs dépendante de l'activité des protéines G auxquels sont liés ces récepteurs (Nieto et al., 1997).

A l'uropode, on retrouve des protéines membranaires impliquées dans l'adhésion ou la signalisation, comme ICAM-1, ICAM-3, CD2, CD43, CD44, et le TCR (del Pozo et al., 1995)(Tibaldi et al., 2002). La relocalisation d'ICAM-3 à l'uropode a été montrée comme étant dépendante des chimiokines (del Pozo et al., 1995). La présence de CD44 et CD43 est probablement régulée par les ERM à qui ils sont liés (Yonemura et al., 1998). Il a en effet déjà été montré que les ERM, grâce à des phases de déphosphorylation/phosphorylation pouvaient favoriser la diffusion de CD43 dans la membrane puis son ré-ancrage ailleurs (Delon et al., 2001). CD2, une glycoprotéine membranaire se relocalise aussi à l'uropode. Cette protéine est impliquée dans le changement de morphologie des LT puisque son

engagement avec des anticorps anti CD2 entraîne une polarisation des LT activés avec la formation de très longs uropodes (Tibaldi et al., 2002).

La PKC ζ qui fait partie de la famille des PKC atypiques et qui se relocalise à la fois à l'uropode et au *leading edge* contribue à la formation de l'uropode et du *leading edge*. Son effet est médié par la protéine échafaudage Par6 (Real et al., 2007).

L'AMPc semble aussi jouer un rôle important pour la formation de l'uropode. Une étude a montré que l'utilisation d'agonistes d'AMPc provoquait la formation d'uropodes (del Pozo et al., 1995).

La Figure 4 présente les différentes étapes de relocalisation des protéines qui mènent à la formation du *leading edge* et de l'uropode dans un LT en réponse à un signal de chimiokines.

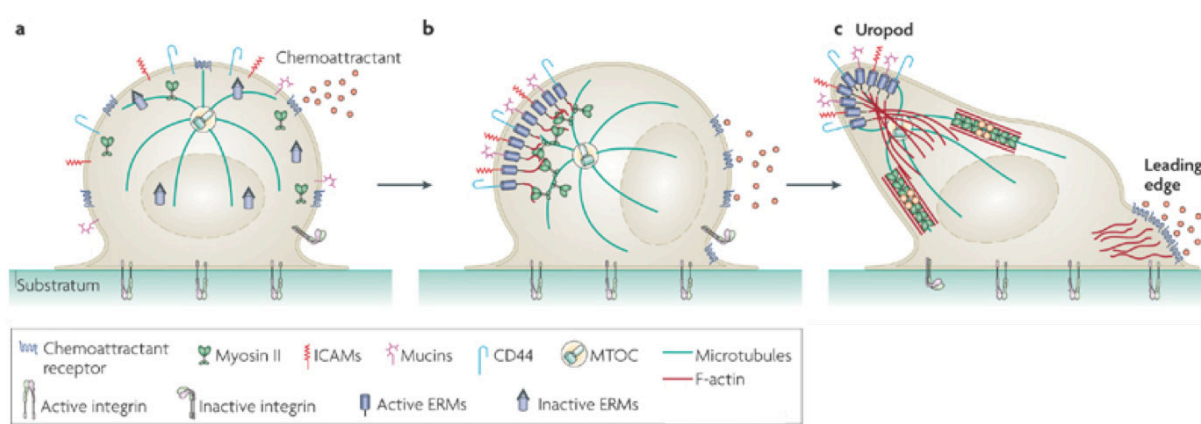


Figure 4: Mécanisme de la formation de l'uropode dans les LT

(a) Localisation uniforme des protéines d'adhésion CD44, CD43 (Mucin), ICAM, et des récepteurs aux chimiokines dans une cellule T au repos sans stimulation. Le MTOC se situe au centre. (b) Les chimiokines entraînent la polarisation du lymphocyte en induisant la liaison des ERM aux récepteurs d'adhésion qui ensemble forment des clusters au pôle opposé à la source de chimiokines. Le MTOC se relocalise à l'arrière. (c) La polymérisation de l'actine et la contraction de l'actomyosine fournissent des forces pour la formation d'une protrusion à l'arrière, l'uropode. Au *Leading edge*, la membrane s'étend sur son support vers l'avant, grâce à la polymérisation de l'actine. Extrait de (Sanchez-Madrid and Serrador, 2009).

A ce jour, un rôle clair n'a pas pu être attribué à l'uropode. Plusieurs hypothèses ont cependant été avancées. L'uropode pourrait être un lieu où la machinerie d'activation se pré-assemble pour faciliter la transmission d'information de cellules à cellule (Tibaldi et al., 2002). Il pourrait aussi avoir un rôle dans les mécanismes de migration en contrôlant la déadhesion et la retraction à l'arrière de la cellule lors de la transmigration à travers les endothéliums. Des protéines impliquées dans l'endocytose, comme AP-2 et la clathrine ont été retrouvées à l'uropode. Celui-ci pourrait alors être un lieu où les protéines seraient recyclées vers le *leading edge* au fur et à mesure que la cellule avance (Sanchez-Madrid and Serrador, 2009).

Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT s'arrêtent pour faire des contacts grâce aux signaux « stop »

Selon le compartiment dans lequel ils se trouvent et les signaux environnementaux qu'ils reçoivent, les LT adoptent des comportements migratoires différents. Dans les organes lymphoïdes secondaires, les LT naïfs scannent les CPA. Durant cette étape, les molécules d'adhésion et le TCR vont conditionner la

stabilité du contact avec la CPA. Ils font partie des signaux « stop » qui provoquent l'arrêt total de la cellule.

Les chimiokines CCL19, CCL20 et CCL21 sécrétées par les cellules stromales des ganglions permettent aux LT d'être guidés dans les zones T.

ICAM-3 (CD50), à la surface des LT, en interagissant avec DC-SIGN sur la CPA permet les premières étapes de scan. Cette étape représente une longue période pendant laquelle le lymphocyte T teste l'affinité de son TCR pour les différents CMH chargés en peptides, à la surface d'une CPA, en ralentissant leur mouvement (Geijtenbeek et al., 2000).

L'engagement du TCR avec son ligand provoque un arrêt de la cellule sur la CPA. Ce mécanisme est médié par le signal calcique (Donnadieu et al., 1994)(Bhakta et al., 2005) et un changement d'affinité des intégrines LFA-1 qui passent dans leur état de haute affinité (Dustin et al., 1997). Cette étape sera abordée dans le chapitre II.3. Si le TCR d'une cellule T ne se lie pas avec une affinité suffisamment forte à son ligand, la cellule ne reçoit pas de signaux « stop » et continue de migrer, contactant au hasard d'autres CPA (Mempel et al., 2004). Il est important de noter que des études ont cependant démontré que des contacts pouvaient se former indépendamment de la présence d'antigènes. Dans ce cas, les zones de contact entre les deux cellules sont moins étendues (Delon et al., 1998a)(Revy et al., 2001).

Les signaux « stop » peuvent être inhibés par des signaux aux effets inverses, les signaux « Go ». Ces derniers sont induits principalement par les chimiokines présentes dans l'environnement de la cellule. Un des mécanismes qui permet d'inhiber ces signaux est de séquestrer les récepteurs aux chimiokines au niveau de la zone de contact. Cette séquestration permet à la cellule de devenir insensible aux gradients chimiokiniques autour d'elle et de ne pas être « distraite » lors de la formation de contacts stables (Molon et al., 2005).

Les signaux stop permettent à la cellule T d'établir des contacts avec les CPA. Ces contacts sont essentiels pour que la cellule T collecte des signaux, à la surface de la CPA, qui vont initier toute une cascade de voies de signalisation intracellulaires menant à l'activation.

Ces événements moléculaires seront décrits dans le chapitre suivant.

II. LA SIGNALISATION INDUITE PAR LES CONTACTS ENTRE LES LYMPHOCYTES T ET LES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES

L'activation de la cellule T mène à la sortie de la phase G_0 , ce qui va permettre à la cellule de se différencier, se diviser et d'activer son rôle effecteur en périphérie. Elle est permise par l'intégration de signaux apportés par une CPA professionnelle préalablement activée.

Les protéines membranaires relayent une information de l'extérieur de la cellule vers le cytoplasme. On distingue quatre types de récepteurs impliqués dans la signalisation des cellules T: les récepteurs impliqués dans la reconnaissance de l'antigène, les récepteurs aux cytokines, ceux impliqués dans l'adhésion et les molécules de co-stimulation CD28/CTLA-4. Le terme de « co-stimulation » fait référence à une stimulation, complémentaire à celle du TCR, qui contribue à la génération d'un signal dans la cellule. Il peut en fait être appliqué à l'ensemble de ces récepteurs. En effet, les effets des récepteurs d'adhésion vont au-delà de la simple cohésion entre les deux cellules puisqu'ils peuvent déclencher une cascade de signalisation et avoir un rôle essentiel dans l'activation des lymphocytes T.

1. LE SIGNAL DU TCR

L'engagement du TCR avec un CMH couplé à un antigène mène à la mise en place de trois voies : la voie calcique, la voie NF- κ B et la voie des MAP kinases. Ensemble, elles aboutissent à l'activation de trois facteurs de transcriptions : NFAT, NF- κ B et AP-1 qui une fois transloqués dans le noyau activent un ensemble de gènes important pour l'activation. Avant de décrire ces voies, j'aborderai les caractéristiques et les mécanismes de transduction du signal à partir du TCR, initiateur de cette cascade d'événements.

A. INITIATION DE LA SIGNALISATION ET SEUIL D'ACTIVATION

Structure du TCR et sensibilité

Le récepteur des cellules T (TCR) est l'initiateur de l'activation des cellules T. Il est composé de deux chaînes : α et β qui reconnaissent ensemble un antigène si celui-ci est présenté dans le sillon d'un complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Dans la suite de ce manuscrit j'utiliserai le terme « agoniste » pour désigner un antigène, présenté sur le CMH, reconnu par le TCR et capable de déclencher une réponse intracellulaire via le TCR. Les parties du TCR qui sont en contact avec l'antigène sont hypervariables et ont été soumises à des recombinaisons génétiques lors de la différenciation des lymphocytes T dans le thymus. La partie intracellulaire est courte et ne joue aucun rôle dans la transduction du signal. L'hétérodimère TCR α/β ne peut pas être exprimé seul à la membrane. Il est accompagné d'un complexe CD3 composé des chaînes γ , δ et ϵ . Celles-ci ont un domaine extracellulaire de type Ig (immunoglobuline) et intracellulaire avec un seul domaine ITAM par chaîne. Ces motifs sont composés de tyrosines qui, une fois phosphorylées par la kinase Lck (décrite dans le chapitre suivant) offrent un lieu d'ancrage pour d'autres protéines. Deux autres chaînes composent le complexe CD3 : les chaînes ζ qui peuvent former un homodimère. Elles n'ont pas de domaine Ig et possèdent trois domaines ITAM chacune dans leur queue intracellulaire. La stoechiométrie de ces chaînes est toujours en cours

d'étude mais il a déjà été rapporté qu'un dimère CD3 γ/ϵ interagirait avec TCR α et un dimère CD3 δ/ϵ interagirait avec TCR β . Le complexe CD3 possède en tout dix motifs ITAM (Call et al., 2002).

Le corécepteur CD4 est aussi impliqué dans l'initiation de cette signalisation dans les LT⁺ CD4⁺. Une cellule T est capable de faire une réponse calcique avec un seul peptide agoniste présenté sur un CMH II à la surface d'une cellule de lignée B murine. Avec 10 peptides agonistes, une synapse immunologique commence à apparaître à la zone de contact. En absence de CD4, il faut en revanche pas moins de 30 peptides agonistes, pour déclencher une réponse calcique. La chaîne CD4 potentialise donc l'effet du TCR en abaissant le nombre de complexes TCR/CD3 nécessaire pour déclencher une réponse (Irvine et al., 2002). Pour les LT⁺ CD8⁺, la reconnaissance est tout aussi sensible : seuls 3 à 5 complexes CMH I couplés à des peptides agonistes peuvent déclencher l'activation de la cellule T. Cette activation est même améliorée grâce à l'interaction entre les CMH I (Brower et al., 1994). Une étude plus récente a même montré que trois complexes de CMH I étaient nécessaires au LT⁺ CD8⁺ pour induire la mort de sa cible (Purbhoo et al., 2004).

Le type de CPA portant le CMH couplé à l'antigène est aussi important pour la sensibilité des cellules T puisqu'une autre étude a montré que le signal calcique pouvait être déclenché dans une cellule T naïve avec une CD mature murine portant une trentaine de CMH à sa surface alors qu'il en fallait des centaines à la surface d'un LB (Delon et al., 1998a). La divergence des estimations du nombre de CMH nécessaires sur un LB, entre l'étude d'Irvine et al., 2002 et Delon et al., 1998., doit provenir des différents modèles de cellules B utilisés dans chacune de ces études.

Il existe de nombreux modèles, qui seront décrits dans la Figure 5, pour expliquer la transduction du signal à partir du complexe TCR/CD3 et des molécules de co-stimulation liées à Lck.

L'équipe de M. Davis en a proposé un en montrant que la reconnaissance d'un antigène agoniste est associée à la reconnaissance d'un peptide endogène (appartenant au soi). Ce mécanisme permet à la cellule d'avoir une meilleure réponse intracellulaire grâce à la formation de pseudo-dimères de TCR avec l'un qui reconnaît un peptide agoniste et l'autre un peptide endogène. La chaîne CD4 est impliquée dans cette pseudo-dimérisation (Figure 5b) (Krogsgaard et al., 2005). Il n'est pas surprenant que ce mode d'activation via des peptides endogènes ait émergé quand on sait qu'une CPA professionnelle possède à sa surface des centaines de milliers de CMH II dont seuls quelques centaines (voire dizaines) sont spécifiques pour un TCR donné. Les peptides endogènes ne semblent pas en revanche avoir un rôle important pour l'activation des LT⁺ CD8⁺ (Spörri and Reis e Sousa, 2002).

Un autre modèle se base sur le changement de conformation des chaînes du TCR. Suite à la liaison d'un ligand sur le TCR, la chaîne CD3 ϵ changerait de conformation en exposant un site où la protéine Nck pourrait se fixer (Figure 5c et d) (Gil et al., 2002). Cette hypothèse a cependant été remise en cause par une étude qui a montré que ce site est déjà accessible à Nck avant même que le TCR soit engagé (Mingueneau et al., 2008).

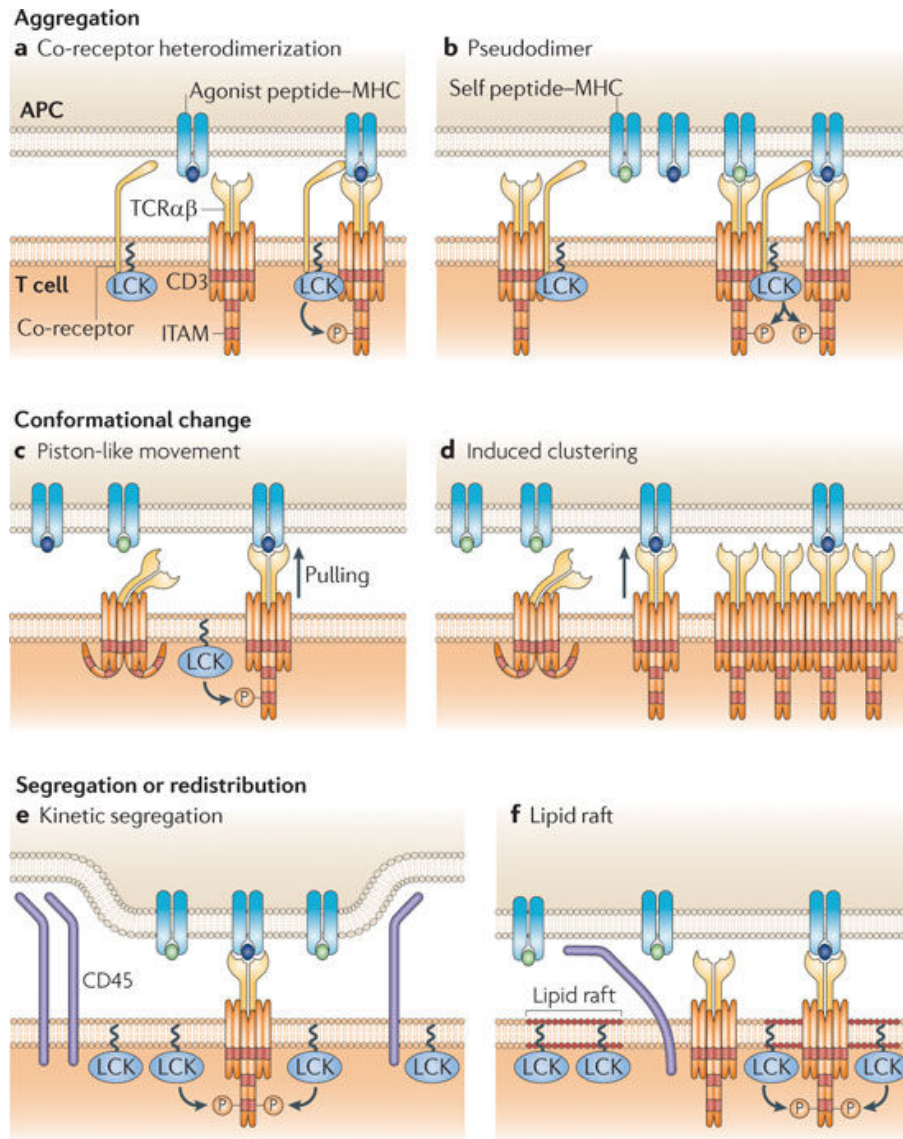


Figure 5: Différents modèles pour expliquer le déclenchement de la signalisation du TCR.

(a) L'hétérodimérisation du co-récepteur : Le co-récepteur CD4 qui lie Lck se rapproche du complexe TCR-CMH, grâce à des sites de liaison sur le CMH. Lck suffisamment proche phosphoryle alors les motifs ITAM (Salter et al., 1990). (b) Pseudodimérisation : C'est la liaison cumulée d'un TCR lié à un peptide agoniste de forte affinité et un autre lié à un agoniste de faible affinité qui entraîne la phosphorylation des motifs ITAM par Lck lié à la chaîne CD4 (Krogsgaard et al., 2005). (c) Force piston : une force mécanique, sur le même modèle que celle créée par un piston est générée par la liaison avec l'agoniste et provoque un changement de conformation des chaînes CD3. Les ITAM sont alors exposés et peuvent être phosphorylés. Ce mécanisme n'a été observé que dans des lymphocytes B avec le BCR (Sun et al., 2001). (d) Induction du regroupement : Les récepteurs se regroupent suite à un changement conformationnel de quelques complexes TCR/CD3 qui ont lié leur agoniste. Les tyrosines des motifs ITAM des CD3, qui étaient enfouies dans la bicouche lipidique, se retrouvent alors exposées et peuvent être soumises à phosphorylation. C'est le modèle du « cran de sureté » (Xu et al., 2008). (e) Ségrégation cinétique : la liaison du TCR provoque une capture des autres TCR les ségrégeant dans une zone étroite loin de la phosphatase inhibitrice CD45. Lck est alors activé dans cette zone et peut phosphoryler les ITAM (Davis and van der Merwe, 2006). (f) Redistribution dans les radeaux lipidiques : L'engagement avec le CMH provoque une redistribution des complexes TCR-CD3 dans des zones enrichies en Lck et appauvries en CD45 : les radeaux lipidiques (Zech et al., 2009). Ce dernier modèle est controversé en raison d'une étude récente qui montre que le regroupement des TCR dans des microclusters, importants pour la signalisation, se fait indépendamment des radeaux lipidiques (Hashimoto-Tane et al., 2010). Figure extraite de (van der Merwe and Dushek, 2011).

Le « serial triggering » : la clé de la persistance du signal

Quels que soient le ou les mécanismes par lesquels le TCR transduit un signal, il faut que celui-ci dure jusqu'à plusieurs heures pour assurer l'activation de la cellule. Paradoxalement, les TCR qui présentent une affinité moyenne avec leur ligand (avec une constante de dissociation élevée) ont plus de chance d'activer la cellule par rapport à ceux qui ont une affinité très forte (une constante de dissociation faible) (Kalergis et al., 2001). Le système est d'autant plus complexe que la quantité de CMH couplés à un peptide agoniste est très limitée à la surface d'une CPA.

Comment un TCR qui a tendance à se détacher plus vite de son ligand (rare) est-il capable de générer la signalisation soutenue nécessaire pour l'activation ? Le modèle du « serial triggering », découvert en 1995 par l'équipe d'A. Lanzavecchia permet de répondre à cette question. Un seul pCMH (CMH associé à un peptide) peut en fait engager et générer un signal en s'engageant jusqu'à 200 fois avec des TCR les uns après les autres. La dissociation d'un complexe entraîne l'internalisation du TCR et son recyclage ou sa dégradation. De nouveaux TCR refont surface, en permanence, à la zone d'interaction pour s'engager avec les pCMH. Le cytosquelette d'actine est requis pour ces aller-retours entre la surface et le cytoplasme (Valitutti et al., 1995a)(Valitutti et al., 1995b).

Ces résultats sont cohérents avec d'autres de la même équipe qui montrent que la cellule peut « compter » le nombre de TCR engagés qui ont généré un signal. La cellule s'active alors si elle a passé un certain seuil (Viola and Lanzavecchia, 1996).

Activation des tyrosines kinases, Lck et ZAP-70 initiatrices de la cascade d'activation

La protéine kinase Lck (p56Lck) est constitutivement liée aux chaînes CD4 et CD8 et peut phosphoryler les motifs ITAM des chaînes CD3 (Barber et al., 1989). Cette phosphorylation est probablement permise par un rapprochement de CD4 et CD8 des chaînes du TCR qu'ils peuvent reconnaître.

Lck est ancrée au niveau de radeaux lipidiques (voir Encart n° 1), dans le feuillet interne de la membrane, grâce à des modifications post-traductionnelles spécifiques. Elle possède une activité kinase qui est régulée par une tyrosine inhibitrice. La kinase Csk la phosphoryle alors que la phosphatase CD45 la déphosphoryle (Hurley et al., 1993).

Une fois phosphorylés par Lck, les motifs ITAM des chaînes CD3 zeta peuvent lier la kinase ZAP-70 qui possède deux domaines SH2 (Chan et al., 1992). Les domaines SH2 ont pour propriété de reconnaître les phospho-tyrosines si elles sont incluses dans un motif spécifique. ZAP-70 positionnée sous le TCR devient alors la cible de Lck qui la phosphoryle en position Y493 ce qui a pour effet de l'activer (Chan et al., 1995).

ZAP-70 phosphoryle ensuite SLP76 et LAT (*Linker of activated T cell*), deux protéines dites d'échafaudage en raison de leur capacité à bâtir un complexe. LAT est incluse dans les radeaux lipidiques alors que SLP76 est cytoplasmique. Ces deux protéines sont reliées ensemble par la protéine GADS (Jordan et al., 2003).

La PLC γ_1 (Phospholipase C) est alors recrutée suite à ces deux évènements et a pour substrat le phospholipide PIP $_2$ (Phosphatidylinositol 3,4 biphosphate). Celui ci sera transformé en IP3 (Inositol 1,4,5 triphosphate) qui pourra diffuser dans le cytosol et en DAG (Diacylglycerol), un autre lipide membranaire (Imboden and Stobo, 1985).

L'IP3 est à l'origine de la voie calcique.

Encart n° 1: Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques ou micro-domaines sont des domaines particuliers de la membrane plasmique, riches en glycosphingolipides et cholestérol, qui ont la propriété d'être résistants aux effets des détergents. Ces plateformes mobiles ont la faculté de regrouper des molécules qui possèdent des motifs particuliers comme le palmitate, présent sur les Src kinases. De nombreuses protéines de signalisation se retrouvent ancrées dans les radeaux comme le complexe TCR/CD3, la kinase Lck, la protéine échafaudage LAT. Une désorganisation de la composition de ces radeaux provoque une perturbation dans la mise en place des signaux précoces de l'activation. La compartimentation des protéines dans ces radeaux est donc essentielle pour une mise en place efficace de l'activation (Xavier et al., 1998).

La molécule de co-stimulation CD28 induit le recrutement de radeaux au niveau de la synapse immunologique (Viola et al., 1999). Ces plateformes permettraient alors d'amplifier l'effet de CD28 puisqu'ils ont la capacité de ségréger des kinases hors de portée des régulateurs négatifs comme cela a déjà été montré (Rodgers and Rose, 1996) (Viola et al., 1999).

B. LA VOIE CALCIQUE

La signalisation calcique dans les lymphocytes T a été mise en évidence très rapidement. Dans les années 80, Arthur Weiss a montré que dans des cellules déficientes en TCR, il était possible de supplémenter le signal TCR en utilisant des phorbols d'esters ou des ionophores calciques (PMA et Ionomycine respectivement) (Imboden et al., 1985)(Weiss and Imboden, 1987). L'ionomycine, qui appartient à la famille des antibiotiques, permet une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium grâce à la formation de pore dans la membrane du reticulum endoplasmique à une faible concentration et dans la membrane plasmique à une plus forte concentration (Chatila et al., 1989).

La réponse calcique en réponse à un signal TCR se passe en fait en plusieurs temps : une première libération de calcium a lieu à partir des stocks du RE. Cette réponse est transitoire mais la déplétion des stocks du RE va mener à l'ouverture des canaux calciques de la membrane plasmique pour laisser entrer le calcium à partir du milieu extracellulaire (Lewis, 2001). Cette seconde réponse, qui peut être oscillante, est bien plus intense et peut se maintenir plus d'une heure pour permettre l'activation. Elle est d'ailleurs responsable du changement de morphologie de la cellule qui va s'arrondir (Donnadieu et al., 1992). La concentration intracellulaire en Ca $^{2+}$ résulte d'un équilibre entre l'ouverture des canaux qui la fait augmenter et les systèmes d'extrusion qui la fait diminuer. Ces derniers sont principalement constitués par des pompes Ca $^{2+}$ ATPases situées dans la membrane du reticulum endoplasmique : les SERCA (*Sarco-*

endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPases) et dans la membrane plasmique : PMCA (Plasma membrane Ca²⁺ATPases) (Lewis, 2001).

L'intensité de la réponse est modulable selon la classe de cellules T, leur état de maturation, le signal fourni par la CPA et la dose d'antigènes présentée (Lewis, 2001). La voie violette dans la Figure 7 illustre cette cascade.

Les différentes étapes de cette réponse seront décrites dans les paragraphes ci-dessous.

Déplétion des stocks calciques du reticulum-endoplasmique et formation de « caps »

L'IP3, messenger secondaire, peut se fixer sur des récepteurs canaux : IP3R (*Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors*) du RE (réticulum endoplasmique) provoquant leur ouverture et la libération de stock de calcium dans le cytosol (Imboden and Stobo, 1985). La concentration intracellulaire atteint alors un pic maximum autour de 500 nM (Lewis, 2001).

Des senseurs calciques ancrés dans le RE détectent la déplétion de ces stocks et peuvent physiquement se rapprocher des canaux calciques, les CRAC (*Calcium Release-Activated Calcium Channels*), dans la membrane plasmique pour interagir avec eux (Park et al., 2009a)(Barr et al., 2008). Les membranes du RE et de la membrane plasmique sont alors proches de 10 nm environ (Barr et al., 2008). Orai1 découverte en 2006 (Vig et al., 2006) est un CRAC qui forme un complexe avec le senseur Stim1 (*sensors stromal interaction molecule 1*), environ 5 à 15 minutes après l'interaction d'une cellule Jurkat avec une surface coatée ou une cellule Raji chargée en super-antigène. Ce complexe apparaît dans la moitié des conjugués et peut se retrouver soit au niveau de la zone de contact (baptisée le *puncta*) (Figure 6B) ou à l'opposé de celle-ci (le *cap*) ou aux deux (Barr et al., 2008). Le *cap* sera décrit dans le chapitre V.1.A.

La protéine STIM1 et le canal Orai1 ont un rôle pivot pour l'activation. Des patients immunodéficients dont le gène codant pour STIM1 présentait des mutations délétères ont été identifiés récemment (Picard et al., 2009)(Fuchs et al., 2012).

Rôle des mitochondries dans la réponse calcique

Les organelles ne sont pas inertes. Comme vu ci-dessus avec l'interaction entre STIM1 et Orai1, le RE est capable d'adapter sa morphologie pour qu'une protéine incluse dans sa membrane interagisse avec une protéine de la membrane plasmique. L'équipe de M. Hoth, a montré que les mitochondries, siège de la production d'ATP, peuvent également se déplacer dans la cellule en utilisant un moteur moléculaire : la kinésine. Elles sont transloquées au niveau de la membrane plasmique, sous la SI, sous l'influence d'un flux calcique. Elles se placent à 200nm de la membrane, proche des CRAC où elles peuvent capturer le Ca²⁺ (Figure 6A). Ainsi en maintenant une concentration calcique faible dans leur environnement proche, les mitochondries évitent aux CRAC de ne pas subir un rétrocontrôle négatif du Ca²⁺. Les CRAC peuvent alors rester ouverts plus longtemps et la cellule peut accumuler plus de Ca²⁺. Les mitochondries, telles des éponges, restituent ensuite le Ca²⁺ qu'elles ont capturé. L'inhibition de la translocation des mitochondries, en ciblant la kinésine, provoque une diminution de l'amplitude du signal calcique et une réduction de la concentration en Ca²⁺ intracellulaire. Les mitochondries les plus proches de la zone d'interaction capturent plus de Ca²⁺ que celles qui sont éloignées (Quintana et al., 2006)(Quintana et al., 2007).

Activation du facteur de transcription : NFAT

Cette variation de calcium libre dans le cytosol provoque une modification du profil d'expression des gènes sous le contrôle du facteur de transcription NFAT.

Avant d'être activé, NFAT est maintenu dans le cytoplasme grâce à des serine/thréonine kinases qui le phosphorylent, empêchant sa séquence de localisation nucléaire d'être reconnue. Ce frein à l'import nucléaire peut être levé grâce à une phosphatase : la calcineurine. Celle-ci est aussi inactive dans les cellules quiescentes et peut être activée par la calmoduline.

La fixation du calcium sur la calmoduline entraîne sa liaison au niveau du domaine régulateur de la calcineurine. Cette dernière subit alors une modification conformationnelle et voit son domaine auto-inhibiteur se déplacer de son site actif. Son activité phosphatase est ainsi activée (Rumi-Masante et al., 2012).

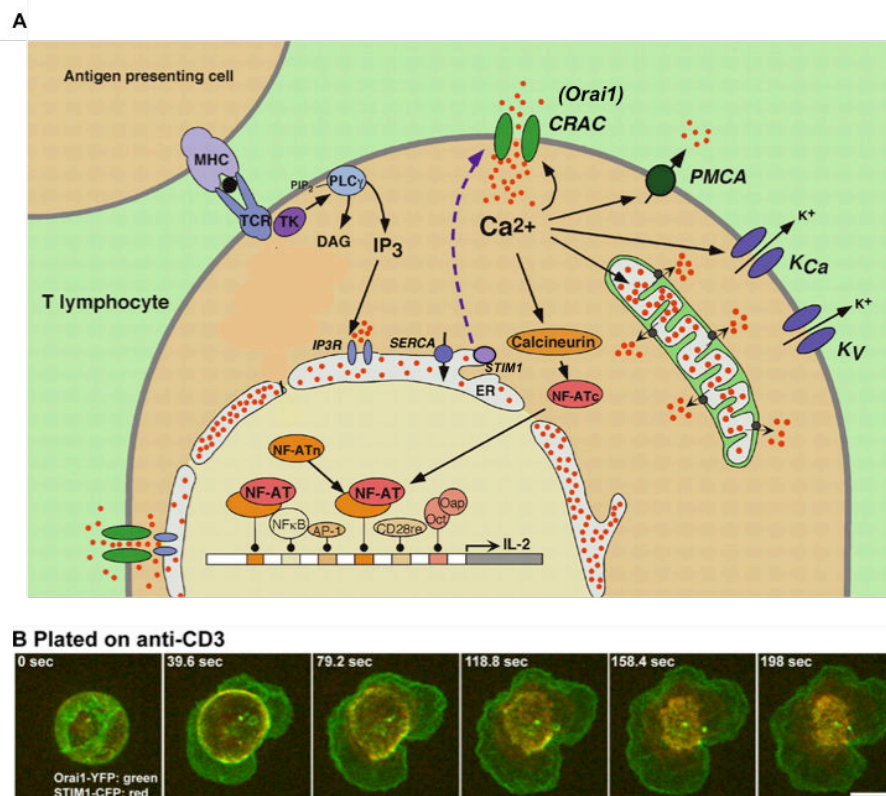


Figure 6: Illustration du signal calcique induit par la PLC γ 1 et de l'interaction STIM1 et Orai1

(A) Schéma de la signalisation calcique déclenchée par la liaison du TCR : Après que ZAP70 ait phosphorylé LAT et SLP76, la PLC γ 1 est recrutée sur LAT et produit du DAG et de l'IP₃ en utilisant le PIP₂ comme substrat. L'IP₃ est capable de se lier sur des canaux calciques du RE entraînant ainsi leur ouverture. La déplétion calcique du RE est détectée par STIM1 qui interagit avec le canal calcique Orai1 au niveau de la membrane. Le flux calcique venant de l'espace extracellulaire est plus important et provoque une cascade d'activation qui va mener à la translocation du facteur de transcription NFAT dans le noyau. Les mitochondries recrutées empêchent l'inactivation par le Ca²⁺ des CRAC en le capturant. NFATc : NFAT cytoplasmique, NFATn : NFAT nucléaire Adapté de (Lewis, 2001). (B) Zone de contact d'une cellule Jurkat transfectée avec Orai1-YFP et STIM1-CFP déposée sur une surface recouverte d'un anticorps anti-CD3. Une co-localisation entre les signaux de STIM1 et Orai1 est détectée, d'abord en périphérie de la zone de contact puis au centre. Extrait de (Barr et al., 2008).

Une fois dans le noyau, NFAT' déphosphorylé pourra former un complexe avec les facteurs de transcriptions AP-1 et NFκB. Cette combinaison va permettre au gène de l'IL2 ((interleukine 2) d'être transcrits (Figure 6A) (Jain et al., 1993)(Negulescu et al., 1994).

C. LA VOIE NFκB

NFκB (nuclear factor-kappa B), qui appartient à la famille des facteurs de transcription Rel, est constitué de deux sous-unités : p50 et p65. Dans des cellules quiescentes, celui-ci est constitutivement lié à son inhibiteur : IκB (*inhibitor of κB*) qui restreint sa localisation au cytoplasme (Rueda and Thome, 2005). Ce facteur de transcription est activé en aval de la PKCθ grâce au DAG, un autre produit de la PLCγ1 selon le mécanisme suivant (Jordan et al., 2003).

La PKCθ activée active CARMA1, une protéine membranaire présente dans un état inactif dans les cellules T quiescentes. Après phosphorylation de deux serines de son domaine linker, CARMA1 change de conformation exposant un site de liaison à BCL10 (Rueda and Thome, 2005). Elle peut également être la cible d'une autre kinase : PDK1 (PI3K-dependent kinase-1). Celle-ci peut interagir avec la PKCθ et CARMA1 et est responsable de leur localisation dans des radeaux lipidiques après une stimulation de cellules Jurkats avec des anti-CD3/anti-CD28 (Lee et al., 2005b).

Le complexe formé de CARMA1, BCL10 et une autre protéine, MALT1, peut ensuite activer le complexe serine kinase IKK (IκB kinase) qui phosphoryle IκB. Cette phosphorylation provoque son ubiquitinylation et sa dégradation. NF-κB est alors libéré et peut être transloqué dans le noyau où il formera un complexe avec deux autres facteurs de transcription : AP-1 et NFAT' (Rueda and Thome, 2005). La voie orange dans la Figure 7 illustre cette cascade.

D. LA VOIE MAP KINASES

La voie des MAP kinases basée sur l'activation de toute une cascade de kinases qui s'activent séquentiellement les unes après les autres, permet l'activation du facteur de transcription AP-1.

Elle est initiée par la petite protéine G : Ras qui nécessite un échange de son GDP en GTP pour être activée. Cette fonction est assurée par des GEF (facteurs d'échange de GTP), qui utilisent cet échange comme un interrupteur moléculaire (Lin and Weiss, 2001). Deux GEF peuvent activer Ras : RasGRP et SOS1. La RasGRP est elle-même activée par la PKCθ alors que SOS1 l'est grâce à son recrutement sur le complexe LAT/SLP76/Grb2.

Une fois activée, Ras permet d'initier la cascade des MAP kinases (*mitogen-activated-protein kinase*). Cette cascade commence par le recrutement à la membrane et l'activation de la serine/thréonine kinase Raf (*MAP kinase kinase kinase*) (Marais et al., 1995). Il s'ensuit l'activation de la tyrosine/thréonine kinase MEK (*MAP kinase kinase*) puis des kinases ERK1/2 (*MAP kinases*) (Leevers and Marshall, 1992). ERK1/2 ainsi que d'autres MAP kinases (p38 et JNK activés par la petite protéine G Rho) peuvent ensuite phosphoryler des facteurs de transcription qui vont promouvoir la transcription des gènes de deux autres facteurs de transcriptions : Jun et Fos. Ces deux facteurs de transcription, une fois exprimés, vont s'assembler pour former ensemble le complexe AP-1. La voie verte dans la Figure 7 illustre cette cascade.

Il est intéressant de noter qu'AP-1, contrairement à NF- κ B et NFAT, n'est pas disponible à l'état inactif dans les cellules quiescentes et est exprimé suite à la mise en place de la voie des MAP kinases.

Une fois activés et transloqués dans le noyau, NFAT, NF- κ B et AP-1 forment ensemble un complexe qui ira se fixer sur le promoteur du gène de l'IL2 pour activer sa transcription (Whitmarsh and Davis, 1996).

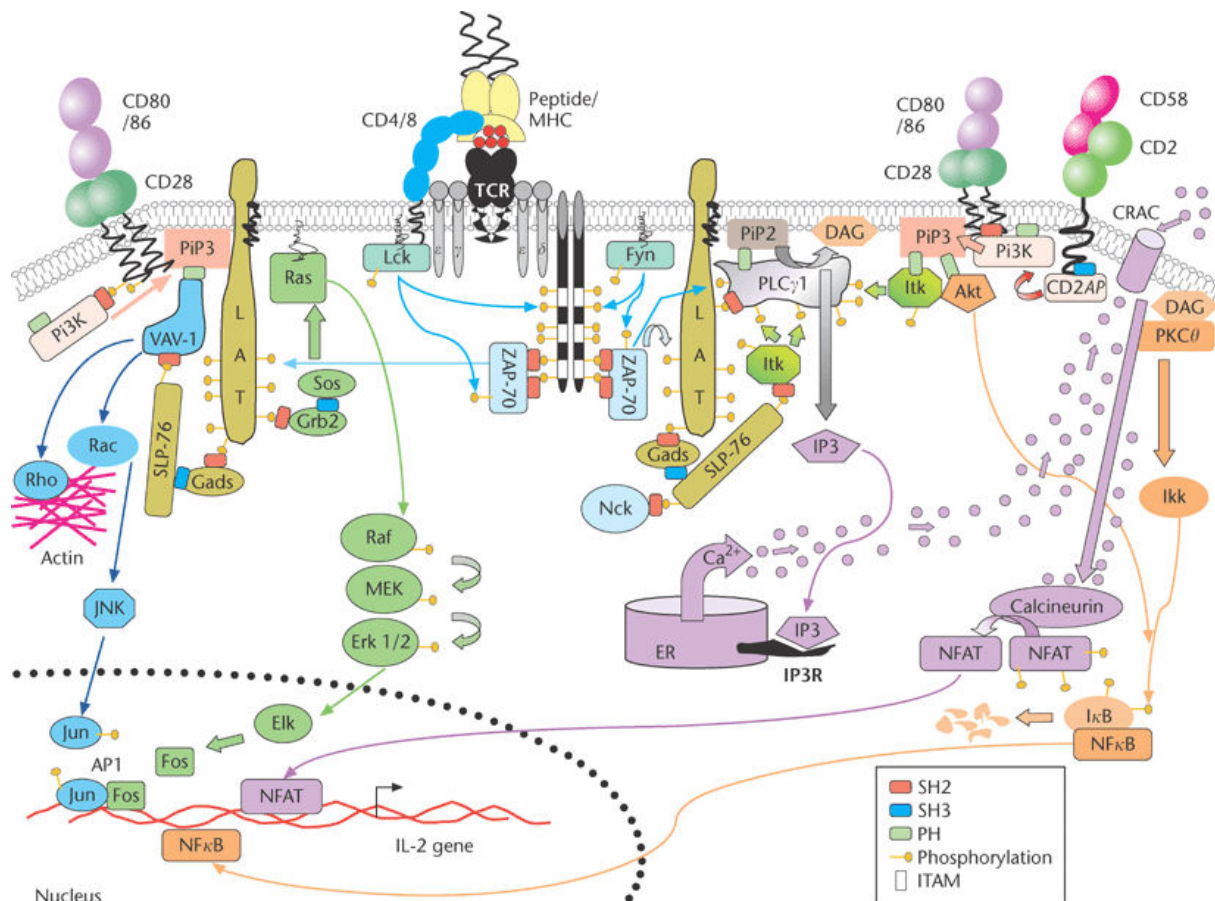


Figure 7: Représentation schématique de la signalisation TCR/CD28 dans les lymphocytes T.

La voie des MAP kinases/AP-1 est ici symbolisée en vert, la voie calcique/NFAT en violet, la voie PKC θ /NF- κ B en orange. Ces trois facteurs de transcription se retrouvent activés dans le noyau pour promouvoir l'expression de l'IL2. La voie CD28, également impliquée dans l'activation et décrite ci-dessous, est aussi représentée sur ce schéma pour plus de clarté. Figure adaptée de (Valitutti and Espagnolle, 2006).

2. LA CO-STIMULATION PAR CD28

CD28, est une protéine co-stimulatrice présente à la surface des cellules T naïves. Elle a pour ligand CD80 et CD86 qu'elle lie avec des affinités différentes. CD86 est exprimée constitutivement sur les CPA professionnelles et surexprimée après l'activation des TLR (*Toll-like-receptor*) alors que CD80 n'est exprimée que plus tard (Linsley et al., 1994).

La liaison de CD28 à son ligand peut être antérieure, simultanée ou postérieure à la reconnaissance d'un peptide spécifique par le TCR. Quand elle est postérieure, CD28 n'a pas d'effet particulier sur la cellule T naïve. Quand un signal TCR se déclenche il permet en revanche de potentialiser sa réponse.

L'absence de co-stimulation CD28 entraîne dans l'organisme une réduction de la prolifération des cellules T (*in vitro* et *in vivo*), une inhibition sévère de la formation des centres germinatifs et du changement de classe isotypique pour les plasmocytes, une diminution de la différenciation des LT naïfs en T_H (*T helper*) et de l'expression de cytokines de types T_H2.

La présence de CD28 à la surface d'une cellule T est estimée à des dizaines de milliers de protéines. La présence de CMH couplés à un peptide spécifique d'un TCR est estimée à quelques centaines seulement. Quand un TCR rencontre son ligand spécifique, la réponse générée, en raison du faible nombre de protagoniste, est plutôt faible et peut mener à l'anergie ou à l'apoptose de la cellule. La présence de CD28 en nombre important permet de pallier à ce bas seuil de sensibilité.

Dans des cellules stimulées à la fois par le TCR et CD28, les expressions de cytokines comme l'IL-2, l'IFN- γ (interferon γ), l'IL-4, de chimiokines, de récepteurs aux chimiokines et cytokines comme l'IL-2R et CXCR5 et de récepteurs comme CD40L (CD40 ligand) et CTLA4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) sont augmentées par rapport à des cellules stimulées seulement par le TCR. Ces événements permettent à la cellule de recevoir une seconde vague de signaux (des heures ou des jours après la rencontre entre une cellule T et la CPA) dans les organes lymphoïdes secondaires et/ou lors de la migration dans les tissus. Ces signaux sont cruciaux pour les fonctions effectrices des cellules T et l'établissement d'une mémoire à long terme (Acuto and Michel, 2003).

CD28 influe sur la prolifération et la différenciation

Il a été montré que CD28, via l'activation de la voie PI3K/Akt (décrite dans le chapitre ci-dessous), et indépendamment de la production d'IL-2, peut agir sur le cycle cellulaire et la prolifération. En phase G₀, les cyclines D dont l'activité régule l'entrée en phase G₁, sont inhibées par KIP (*cyclin-dependent kinase inhibitor*). CD28 agit à ce niveau-là en entraînant la dégradation de KIP, levant ainsi un frein à l'activité des cyclines (Acuto and Michel, 2003)(Appleman et al., 2002). CD28 peut aussi intervenir sur l'augmentation de l'expression des cyclines D. Ces événements ont lieu 3 à 4 heures après l'établissement d'un contact (Acuto and Michel, 2003).

La différenciation des cellules T est permise par un contexte cytokinique particulier dans une fenêtre de temps précise. Il avait déjà été montré que CD28 améliorait l'expression d'IL-2 dans des cellules naïves mais le mécanisme n'était pas clair. En 2003, une équipe a mis en évidence un mécanisme d'origine

épigénétique. Dans des cellules stimulées par le TCR et CD28 pendant 20 minutes, il a été montré que la présence de CD28 réduisait l'état de méthylation de l'ADN au niveau de la zone 'enhancer' du promoteur du gène de l'IL-2 (Bruniquel and Schwartz, 2003). Cette cytokine exprimée par une cellule T naïve peut avoir des effets autocrines puisque la cellule voit également son niveau d'IL2-R augmenter après une stimulation CD3/CD28 (Acuto and Michel, 2003).

La signalisation par CD28 et la voie de la PI3K

Il est important de noter que les protéines en aval de la signalisation de CD28 ne sont pas spécifiques de cette voie. CD28 partage en effet des acteurs de signalisations avec la voie du TCR et renforce certaines réactions. Contrairement au complexe TCR/CD3, il ne possède pas de motifs ITAM mais possède en revanche des tyrosines et un motif riche en prolines dans sa queue cytoplasmique. Comme pour le complexe TCR/CD3, c'est Lck qui effectue la première phosphorylation sur sa queue cytoplasmique quand il se lie à son ligand.

La sous-unité régulatrice de la chaîne p85 de la PI3K (phosphatidylinositide 3-kinase) peut alors se fixer sur CD28. Se retrouvant ainsi activée au niveau de la membrane, la PI3K peut produire du PIP₃ (Phosphatidylinositol (3,4,5-triphosphate) à partir du PIP₂. Cela entraîne le recrutement et l'activation d'Akt qui se fixe au PIP₃ par son domaine PH.

Une fois activé, la kinase Akt peut intervenir au niveau du métabolisme par l'augmentation de l'utilisation du glucose grâce à la surexpression de Glut1 (Frauwirth et al., 2002)(Barthel et al., 1999). Cette anticipation de production d'énergie sera bénéfique pour l'entrée en phase G1 et S qui surviendra lors de la prolifération. Akt peut aussi phosphoryler la protéine GSK3 qui empêche la sortie du noyau de NFAT mais aussi activer des MAP kinase kinase kinases en amont du facteur de transcription NF-κB (Acuto and Michel, 2003).

CD28 est également capable d'activer, deux autres protéines, Vav1 et Itk en interagissant directement avec elles. Ces deux protéines sont importantes pour l'activation. Vav1 activé stabilise le complexe LAT/SLP76 tandis que Itk est nécessaire pour l'activation de la PLCγ1 (Acuto and Michel, 2003).

Ces mécanismes médiés par GSK3, les MAP kinase kinase kinase, vav1 et Itk contribuent tous à augmenter l'expression de l'IL-2, en convergeant vers les facteurs de transcriptions NFAT et NF-κB (Figure 8).

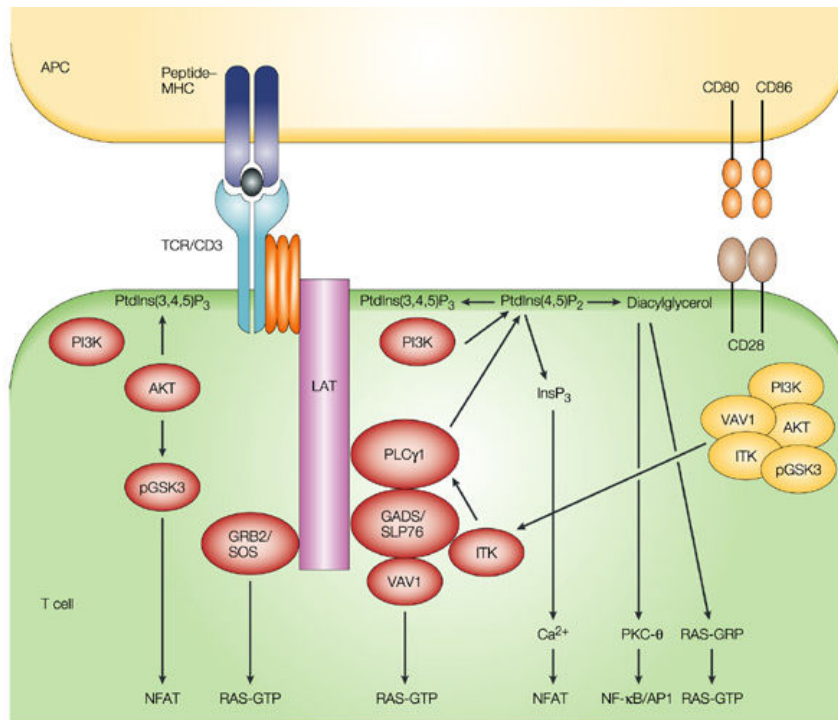


Figure 8: Effet de CD28 sur la cascade du TCR

Activé par CD28, Vav1 renforce la stabilité du complexe LAT/SLP76 et ITK active la $PLC\gamma_1$. La $PLC\gamma_1$ produit de l'IP3 ce qui entraîne le déclenchement du signal calcique et l'import de NFAT dans le noyau. La PI3K produit du PIP3 qui permet à Akt de s'ancrer dans la membrane grâce à son domaine PH. Akt peut ensuite phosphoryler la GSK3 qui contrôle l'export de NFAT du noyau. Extrait de (Acuto and Michel, 2003)

3. LA CO-STIMULATION PAR LES INTÉGRINES

Une autre protéine est importante dans les signaux de co-stimulation, c'est l'intégrine LFA-1. C'est avant tout une molécule d'adhésion. Dans les lymphocytes T, elle est essentielle pour leur arrêt sur les endothéliums (Mentzer et al., 1986), leur capacité de migration (Oppenheimer-Marks et al., 1991) et leur activation lors de l'interaction avec une CPA (Davignon et al., 1981). C'est une des premières molécules à s'engager avec son ligand à la zone de contact entre un LT et une CPA.

Dans cette partie, je me concentrerai sur les mécanismes d'adhésion par ces molécules au moment où la cellule T contacte une CPA et la façon dont ces mécanismes influent sur l'activation.

A. L'INTÉGRINE LFA-1 PEUT MODULER SON AFFINITÉ.

Les intégrines représentent une famille de protéines composée de chaînes α et β . On dénombre chez l'homme une variété de 18 chaînes α et 8 chaînes β générant ensemble 24 combinaisons. L'intégrine LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$) présente à la surface des lymphocytes joue un rôle majeur dans les processus d'adhésion et la mise en place de l'activation des lymphocytes T. Celle-ci interagit avec ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102) et ICAM-3.

En plus d'être considérée comme une molécule d'adhésion, c'est aussi un récepteur puisqu'elle peut transmettre une information dans les deux sens, une caractéristique qui sera abordée dans le chapitre suivant.

LFA-1 possède des capacités de repliements originales qui vont conditionner son affinité avec son ligand. Elle peut adopter trois types de conformation (voir Figure 9):

- La forme repliée fermée : les chaînes α_L et β_2 sont étroitement liées du côté intracellulaire et extracellulaire. Cette conformation est associée à une faible affinité avec ICAM1.
- La forme dépliée fermée : Les domaines des 2 chaînes intracellulaires sont toujours étroitement liés mais les domaines extracellulaires sont dépliés exposant ainsi des zones qui n'étaient pas exposés dans la forme repliée fermée. Cette conformation présente une affinité intermédiaire avec ICAM1.
- La forme dépliée ouverte : Tous les domaines extracellulaires sont exposés et les domaines intracellulaires des deux chaînes sont plus éloignés entre eux. C'est la forme de plus haute affinité avec ICAM1. (Nishida et al., 2006).

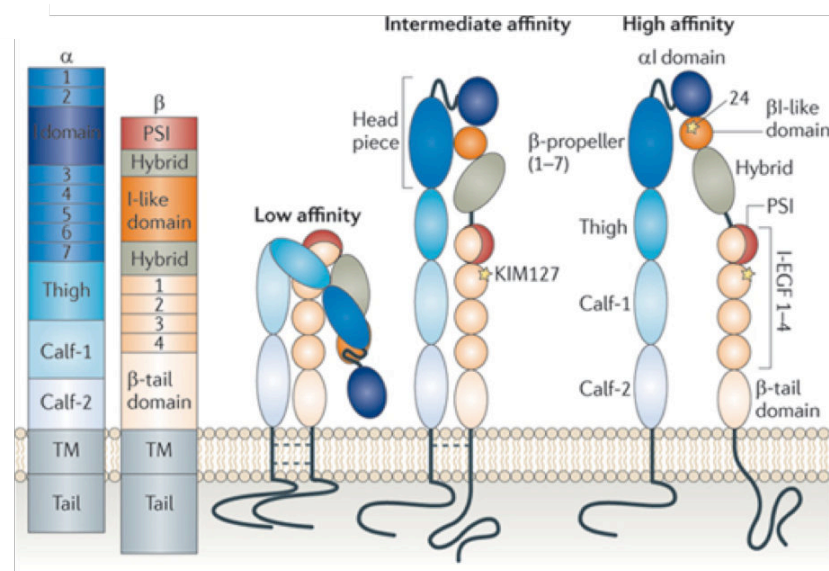


Figure 9: Les trois conformations de LFA-1.

Le passage de la première à la seconde conformation se fait grâce à une stimulation chimiokinique et du TCR (signal *inside out*). La protéine se déploie vers l'extérieur de la cellule. Son état d'affinité pour ICAM-1 est alors intermédiaire.

Le passage de la seconde à la troisième conformation est permis et stabilisé par la liaison de son ligand. Les forces exercées par le ligand vont permettre de générer une cascade de signalisation dans la cellule menant à l'écartement des deux chaînes et son passage vers un haut état d'affinité pour ICAM-1. Les étoiles symbolisent des épitopes sensibles aux différentes conformations. Figure extraite de (Hogg et al., 2011).

B. LES VOIES DE SIGNALISATION RELIÉES À LFA-1

Ces changements de conformation décrits ci-dessus se font de manière séquentielle et sont permis grâce à une signalisation intracellulaire générée par une stimulation par les chimiokines et/ou le TCR qu'on appelle signal *inside out* mais aussi par l'engagement de LFA-1 avec son ligand ICAM1 qui va mener au

signal *outside in*. Le signal *inside out* permet en fait le passage de LFA-1 vers sa conformation d'affinité intermédiaire et le signal *outside in* finalise ce dépliement vers la conformation de haute affinité.

Le signal inside out lors de l'interaction LT-CPA

Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, les lymphocytes T sont soumis à des stimulations chimiokines de la part de CCL21, CCL19 et CXCL12 secrétées par les cellules stromales des zones T (Gunn et al., 1998). Ils sont également stimulés par leur TCR lors des contacts avec des CPA. Ces stimulations vont orchestrer la première étape de l'activation de LFA-1 : l'*inside out*. Les connaissances sur la mise en place de cette signalisation étant encore très fragmentées, j'évoquerai ci-dessous une partie des acteurs impliqués à ce jour dans l'*inside out* en faisant le lien entre eux si cela est possible.

Les signaux chimiokines et du TCR stimulent la PLD1 (phospholipase D1) qui stimule à son tour la PIP5K1 γ 87. Cette kinase, localisée à la membrane cellulaire, produit, un phospholipide membranaire, PIP₂ et a un rôle crucial pour l'activation de LFA-1 (Bolomini-Vittori et al., 2009).

En 1989, une étude de M. Dustin et T. Springer a montré que l'activation du TCR seule stimule l'adhésion par LFA-1. La notion de changement de conformation n'avait pas été encore découverte mais les auteurs parlaient d'une variation notable de l'avidité de LFA-1 quand les cellules étaient stimulées (Dustin and Springer, 1989).

De nombreux acteurs qui relient le TCR à LFA-1 ont ensuite été identifiés. Deux kinases très en amont de la signalisation du TCR (Lck, ZAP-70) jouent un rôle crucial dans l'augmentation de l'affinité des intégrines après une stimulation TCR (Fagerholm et al., 2002).

La protéine adaptatrice ADAP qui peut se fixer à SLP76 a également un rôle dans ce signal d'adhésion. Son rôle est médié par son interaction avec SKAP55 qui provoque la translocation à la membrane de la GTPase Rap1. La PLD1 peut aussi favoriser cette translocation. Ces cinq protéines ont chacune montré un rôle important dans l'adhésion médiée par LFA-1 (Wang et al., 2003) (Bivona et al., 2004) (Kliche et al., 2006) (Peterson et al., 2001) (Mor et al., 2009).

Comment Rap1 peut-il agir sur LFA-1 ? Une fois à la membrane, Rap1 est alors activé (par un échange du chargement en GDP vers GTP) par les GEF : C3G et CALDAG-GEF1. L'activité et la localisation membranaire de ces GEF dépendent également d'une stimulation TCR et/ou chimiokines (Shimonaka et al., 2003) (Gotoh et al., 1995) (Katagiri et al., 2004) (Mor et al., 2009). C'est ensuite en se liant au complexe RapL-SKAP55 que Rap1 pourrait alors se retrouver proche de la membrane où il interagirait directement avec la chaîne α_L (Katagiri et al., 2003).

Deux autres protéines, la taline et la kindline, qui se lient directement à la chaîne β ont montré des rôles essentiels dans le changement d'affinité de LFA-1.

La taline peut, par son domaine FERM3, lier la chaîne β des intégrines sur son domaine conservé NPXY induisant ainsi son dépliement (Calderwood et al., 2002). Dans des cellules T au repos, elle est liée à la

GEF vav1 ce qui a pour effet d'empêcher sa liaison ailleurs. Ce complexe ne se lie d'ailleurs que très faiblement à la queue cytoplasmique β de LFA-1 (Fischer et al., 1998).

La kindline est une protéine mise en cause dans la maladie de défaut d'adhésion des leucocytes de type III (LADIII) (Svensson et al., 2009). Elle possède des domaines de fixation à la chaîne β et c'est en occupant un domaine très exposé sur cette chaîne qu'elle optimiserait la liaison de la taline sur LFA-1 par coopérativité (Moser et al., 2009). Un autre effet de la kindline pourrait être médié par son action sur la filaminine, une protéine du cytosquelette qui occupe le même site que la taline sur la chaîne β (Kiema et al., 2006). La kindline associée avec une autre protéine : la migfiline, pourrait abolir cet effet de compétition en délogeant la filaminine de son site de liaison sur la chaîne β_2 le laissant ainsi libre pour la taline (Lad et al., 2008).

L'ensemble de ces facteurs régulé par une stimulation chimiokinique ou du TCR contribue ainsi à la liaison de la taline sur la chaîne β_2 et Rap1 sur la chaîne α_L , ce qui provoque un changement de conformation vers la forme dépliée ouverte (d'une affinité intermédiaire avec son ligand ICAM-1). Ce dépliement représente l'aboutissement de la signalisation *inside out* (Figure 10).

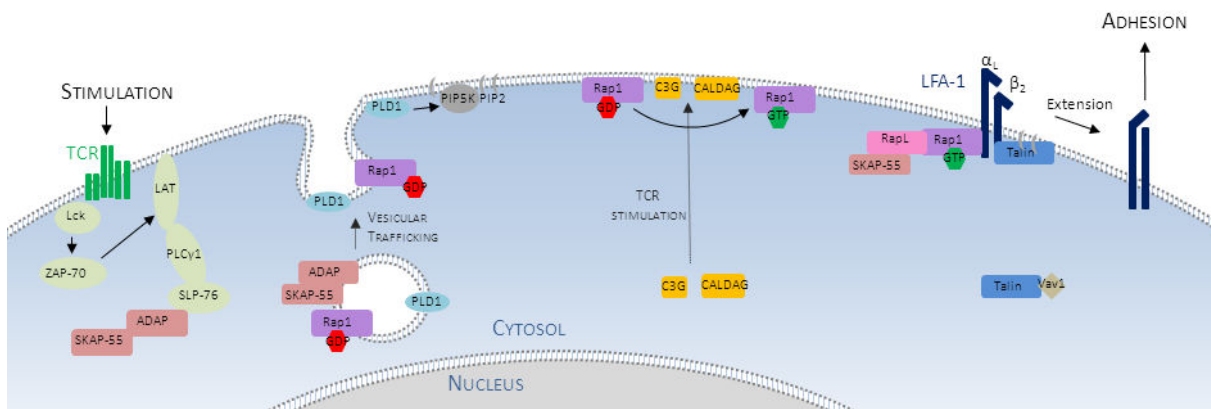


Figure 10: Régulation du signal *inside out* en réponse à une stimulation TCR.

Suite à une stimulation TCR, SLP76 activée par ZAP70 se lie à ADAP. Ce dernier peut interagir avec SKAP55 via son domaine SH3. La formation de ce complexe et la présence de la phospholipase D1 dans les vésicules d'export permettent le recrutement de Rap1 à la membrane. L'export membranaire des GEFs C3G et CALDAG-GEF1 suite à une stimulation TCR permet à Rap1 d'être activée au niveau de la membrane plasmique. Rap1 chargée en GTP peut ainsi se lier au complexe RapL-SKAP-55. Il peut alors se lier à la chaîne α_L de LFA-1. La présence de PIP₂ à la membrane, synthétisés par la PIP5K activée par la PLD1, favorise l'ancrage de la taline dans la membrane et son association à la chaîne β_2 . LFA-1 peut ainsi se déployer partiellement pour atteindre un état d'affinité intermédiaire.

Le signal outside in lors de l'interaction LT-CPA

Ce signal fait référence à la signalisation générée par les intégrines suite à leur interaction avec leur ligand : ICAM-1. Celui-ci, va générer une pression sur LFA-1 et c'est à l'origine de cet événement qu'une cascade de signalisation va se mettre en place sous LFA-1. La finalité de cette réponse mène à un renforcement de l'adhésion grâce à un passage de l'intégrine de la conformation « dépliée fermée » à « dépliée ouverte ».

Les kinases Lck et ZAP70 déjà impliquées dans la mise en place de l'activation de la cellule T et dans le signal *inside out* jouent également un rôle dans le signal *outside in*. Ces deux kinases sont constitutivement associées à LFA-1 dans des cellules au repos. Quand LFA-1 se lie à son ligand ICAM1, leur niveau de phosphorylation augmente et cela résulte en une conversion de LFA-1 vers son état de haute affinité. Étant donné que Lck et ZAP-70 pourraient aussi être impliquées dans le signal *inside out*, on pourrait envisager que le signal *outside in* ne peut évidemment pas se faire si les premières étapes de l'*inside out* sont bloquées. Pour vérifier cette hypothèse, une étude a été menée avec des anticorps qui détectent strictement la forme dépliée fermée ou dépliée ouverte. Ainsi, une inhibition de Lck n'empêche pas la détection de la forme dépliée fermée mais altère drastiquement la détection de la forme dépliée ouverte démontrant ainsi l'importance de ces protéines pour le signal *outside in* (Evans et al., 2011). Pour que Lck interagisse avec LFA-1, celle-ci doit être phosphorylée (Evans et al., 2011). Dans une cellule T au repos il a déjà été rapporté que 40% du pool total de Lck était constitutivement phosphorylé et que cela était totalement indépendant d'une stimulation TCR (Nika et al., 2010). C'est probablement grâce à ce pool, que l'interaction Lck-LFA-1 est permise.

La taline déjà impliquée dans le processus *inside out* est aussi impliquée dans celui d'*outside in*. Ses effets sont étroitement liés à ceux de vav1. Comme expliqué plus haut pour le signal *inside out*, vav1 est lié à la taline et cette interaction constitue un frein à sa liaison complète à la chaîne β_2 . L'activation de ZAP-70 initiée non pas par les récepteurs aux chimiokines ou à l'antigène comme dans le cas du signal *inside out* mais par la liaison de LFA-1 à ICAM-1 pourrait lever ce frein en phosphorylant vav1 et libérant ainsi le deuxième site de liaison à la chaîne β_2 que possède la taline (voir Figure 11).

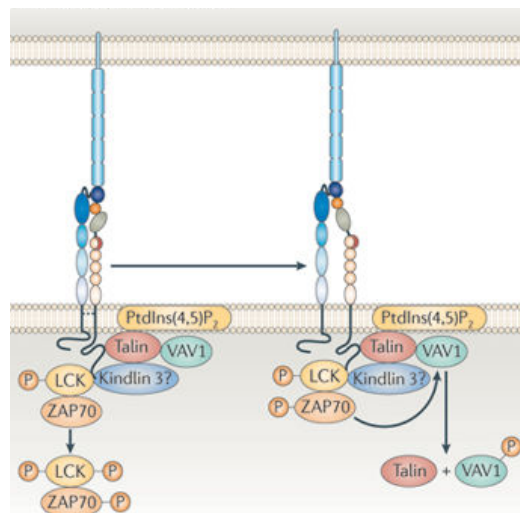


Figure 11: Passage de la conformation dépliée fermée à dépliée ouverte de LFA-1.

Un pool de Lck est constitutivement associé à LFA-1 dans les cellules au repos. Lck est alors phosphorylé et phosphoryle ZAP-70 à son tour. En phosphorylant VAV1, ZAP-70 pourrait libérer la taline qui se fixerait ainsi mieux sur la chaîne β_2 . La kindline occupe des sites en commun avec la taline et exerce également un rôle régulateur pour cette dernière phase de repliement comme abordé plus haut pour le signal *inside out*. Figure extraite de (Hogg et al., 2011).

La chaîne α_L fait aussi l'objet de liaison par la protéine RapL (activée par Rap1). Cette interaction joue un rôle essentiel pour la deuxième phase d'activation de LFA-1 (Ebisuno et al., 2010).

Ces données démontrent que les molécules qui régulent le signal *inside out* peuvent aussi réguler le signal *outside in*. Pour cette raison, il est difficile de bien dissocier les mécanismes de ces deux phénomènes.

C. EFFET DES INTÉGRINES SUR L'ACTIVATION ET L'ACTIVITÉ EFFECTRICE DES CELLULES T

Sensibilisation par l'adhésion

Les signaux d'adhésion peuvent permettre à la cellule T d'augmenter son niveau de sensibilité du signal TCR. Ce mécanisme appelé AITCP (*adhesion-induced T cell priming*) est médié par le messager secondaire, l'AMPc (l'adénosine Monophosphate cyclique). L'équipe de Clotilde Randriamampita a montré qu'une hausse transitoire de la concentration en AMPc a un rôle positif pour la signalisation du TCR (Conche et al., 2009). Grâce à une sonde fonctionnant sur le principe du FRET, une augmentation transitoire d'AMPc a été détectée une minute avant la réponse calcique dans des cellules T primaires humaines adhérant à une surface ou sur une CPA. Cette augmentation d'AMPc transitoire entraîne alors l'activation des kinases ERK (*Extracellular-signal Regulated Kinase*). Cette activation, en fait indirecte, passe par l'inhibition des phosphatases d'ERK comme HePTP (*hematopoietic protein tyrosine phosphatase*) (Conche et al., 2009)(Saxena et al., 1999). La mise en place de cette signalisation confère un avantage aux cellules T stimulées par le TCR. Le signal calcique, en réponse à des anticorps anti-CD3, est en effet potentialisé par l'adhésion. Cet avantage peut durer jusqu'à 6 minutes après l'élévation transitoire du niveau d'AMPc (Conche et al., 2009)(Randriamampita et al., 2003).

Cette étude a ajouté une dimension temporelle à ce messager secondaire qui avait été décrit jusque là comme un régulateur négatif de l'activation T (Tamir et al., 1996) et montrent que la cellule peut abaisser son niveau de sensibilité au TCR quand elle passe d'un état en suspension à adhérente.

Cet effet de sensibilisation par l'adhésion a également été retrouvé dans des lymphocytes T cytotoxiques. L'adhésion, médiée par des intégrines $\beta 1$ et $\beta 3$, est importante pour le caractère cytotoxique des LT CD8⁺. Une étude a montré que dans des lymphocytes T CD8⁺, l'adhésion à une surface recouverte de fibronectine (une glycoprotéine surtout présente dans les matrices extracellulaires et à la surface des cellules cibles) était nécessaire pour la réponse calcique, l'activation et la dégranulation de ces cellules, en réponses à un CMH monomérique couplé à un peptide spécifique (Doucey et al., 2003). La kinase Pyk2 qui appartient à la famille des FAK (*Focal adhesion kinase*), est impliquée dans ce mécanisme. Des expériences de FRET ont en effet montré qu'en réponse à l'adhésion, elle se retrouve associée à des src kinases activées (Lck et Fyn) et une protéine liée au cytosquelette, la paxilline, dans un état phosphorylé. Un signal d'adhésion couplé à un signal de TCR provoque une agrégation de ces complexes dans des radeaux lipidiques au niveau des points d'adhésion (Doucey et al., 2003). La régulation et le mode de recrutement de Pyk2 et ses partenaires, en réponse à un signal d'adhésion, n'ont pas encore été découverts à ce jour.

Ce phénomène de sensibilisation par l'adhésion observé à la fois dans des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ doit probablement contribuer à la haute sensibilité de détection des antigènes dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus périphériques. Dans ces compartiments, les signaux d'adhésion peuvent être apportés par les nombreux contacts avec les CPA et la matrice extracellulaire (Randriamampita et al., 2003).

L'adhésion peut générer un signal calcique

D'autres études ont montré que LFA-1 était aussi capable d'induire un signal calcique dans les lymphocytes T en activant la PLC γ 1 (Kanner et al., 1993). Cette étude reste cependant discutable en raison de l'utilisation d'anticorps anti CD18 ou CD11a plutôt qu'un ligand naturel de LFA-1 comme ICAM1. Une étude plus récente sur LFA-1 dans les neutrophiles va aussi dans le sens de cette hypothèse. Un flux calcique dépendant d'Orai1 est observé au niveau des clusters de LFA1 de haute affinité au *leading edge* et permet alors au neutrophile de s'orienter. Ce flux est dépendant de l'état de haute affinité de LFA-1 (Dixit et al., 2011).

L'adhésion favorise la translocation des mitochondries à la zone de contact

Le signal *outside-in* de LFA-1 est impliqué dans la translocation des mitochondries, dans les lymphocytes T, au niveau de la zone de contact avec la CPA, ce qui a pour effet d'amplifier et d'améliorer la réponse du TCR (cf chapitre II.1.B).

Alors que (Quintana et al., 2007) ont montré que cette translocation était dépendante du signal TCR, (Contento et al., 2010) ont montré qu'elle était seulement dépendante d'un signal d'adhésion de LFA-1 converti dans son état de haute affinité grâce à des récepteurs à la chimiokine CXCL12. Dans cette dernière étude, les auteurs ont aussi montré que les mitochondries étaient transloquées à la zone de contact en présence d'un signal d'adhésion et chimiokinique mais que cette translocation devenait plus stable en présence d'un signal du TCR.

L'adhésion serait en fait suffisante pour permettre le mouvement des mitochondries et le signal TCR jouerait un rôle dans la maintenance de leur position une fois celles-ci relocalisées.

4. TERMINAISON DU SIGNAL PAR DES PROTÉINES INHIBITRICES

L'activation des cellules T n'est pas un processus sans fin. Une fois enclenchée, elle est régulée par d'autres voies qui vont interférer avec les cascades de signalisation mises en place. Cette balance entre une signalisation positive et négative est nécessaire pour permettre une réponse immune efficace, maintenir une tolérance et éviter l'auto-immunité. Sans ce frein, la réponse des cellules T s'emballe et ne cesse d'avoir des effets même après la résolution d'une infection.

J'aborderai, ci-dessous, les mécanismes d'inhibition de deux molécules : CTLA-4 et PD-1

A. CTLA-4

CTLA-4 n'est exprimé dans les cellules T qu'après activation ou de façon constitutive sur des cellules T régulatrices (CD4⁺ CD25⁺). L'ARNm de CTLA-4 est détecté après 1 heure d'engagement du TCR et le

pic est atteint entre 24 et 36 heures de stimulation (Perkins et al., 1996). C'est d'ailleurs à ce moment-là seulement que CTLA-4 peut être détecté à la surface de la cellule.

Comment est régulée l'expression de CTLA-4 à la surface de la cellule ? CTLA-4 a la capacité de rester dans des vésicules intra-cytoplasmiques proche du MTOC avant d'être exporté à la membrane. Dans des cellules T quiescentes, son export est contrôlé en partie par AP-1 qui peut se fixer sur sa queue cytoplasmique quand il est encore dans le Golgi (Schneider et al., 1999). L'export de CTLA-4 à la membrane est aussi contrôlé par l'engagement du TCR et le flux calcique. Son accumulation au niveau de la zone de contact est d'ailleurs proportionnelle à l'intensité du signal TCR (Linsley et al., 1996)(Egen and Allison, 2002). Son endocytose est contrôlée par AP-2 qui le dirige vers des lysosomes pour être dégradé (Schneider et al., 1999). Le flux calcique a pour effet d'empêcher indirectement la liaison d'AP-2 à CTLA-4 en entraînant la phosphorylation de son domaine intracellulaire. Cette phosphorylation permet alors d'améliorer la réponse générée par CTLA-4 puisque celui-ci n'est pas internalisé (Egen and Allison, 2002).

Des souris déficientes pour CTLA-4 peuvent vivre jusqu'à 3 à 4 semaines seulement en raison des nombreuses pathologies auto-immunes qu'elles développent. Ces souris ont 4 à 5 fois plus de lymphocytes que des souris sauvages et ont des organes lymphoïdes secondaires plus gros que la moyenne (Waterhouse et al., 1995). De façon intéressante, des souris qui ont reçu dans des proportions égales de lymphocytes T CTLA-4^{-/-} et CTLA-4^{WT} ne montrent pas de syndromes lymphoprolifératifs. La seule présence de CTL-4 sur une partie des cellules T de l'organisme permet alors de les protéger par la sécrétion de molécules inhibitrices (Bachmann et al., 2001). Ces éléments vont plutôt en faveur d'un rôle inhibiteur et homéostatique de CTL-4.

CTLA-4 se lie aux mêmes ligands que CD28, c'est à dire CD80 et CD86, mais peut les lier avec une affinité et avidité jusqu'à 100 fois plus forte (Linsley et al., 1994). Ces données indiquent que le signal inhibiteur généré par cette molécule doit être bien plus fort et dominant par rapport à celui généré par CD28.

Par quels mécanismes CTLA-4 peut exercer son rôle inhibiteur ? CTLA-4 peut, par compétition, séquestrer les ligands préalablement fixés sur CD28. Ce mécanisme, bien qu'insuffisant, constitue déjà un mode de régulation négatif (Carreno et al., 2000).

Le mécanisme suivant pourrait aussi permettre d'expliquer son rôle inhibiteur. Suite à l'engagement de CTLA-4, des tyrosines de sa queue intra-cytoplasmique sont phosphorylées par des Src kinases et cela entraîne la libération de la phosphatase PP2A qui est liée à sa queue de façon constitutive. Une fois libérée, PP2A peut aller inhiber la PI3K en se fixant sur sa sous-unité régulatrice p85 (Baroja et al., 2002). La phosphorylation de CTLA-4 permet aussi le recrutement d'une autre phosphatase, la SHP2 (*SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-2*) qui peut faire décroître la phosphorylation des tyrosines des chaînes du TCR mais aussi de la protéine échafaudage LAT (Teft et al., 2006).

B. PD-1

PD-1 (*programmed death*) est également induit dans des cellules T activées. Il peut aussi être retrouvé sur des lymphocytes B et des macrophages (Agata et al., 1996).

Son ligand PD-L1 est retrouvé constitutivement sur des cellules non lymphoïdes (cœur, poumon et placenta) ce qui a pour effet de limiter les réponses inflammatoires dans ces tissus périphériques. PD-L1 est aussi retrouvé dans certaines tumeurs comme les mélanomes. Les lymphocytes T intra-tumoraux, isolés de ces tumeurs, présentent en plus une surexpression de PD-1 et sont anergiques. Le mécanisme d'inhibition des effets des lymphocytes T par PD-1 est en fait détourné par la tumeur pour échapper à sa détection. La présence de ces deux marqueurs est associée à un mauvais pronostic pour les patients (Chapon et al., 2011).

Par quel mécanisme PD-1 régule négativement la signalisation ?

Les motifs ITIM (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif*) et ITSM (*immunoreceptor tyrosine-based switch motif*) constituent la queue cytoplasmique de PD-1. Les phosphatases SHP-1 et SHP-2, qui peuvent lier le motif ITSM de façon constitutive, exercent leur effet inhibiteur seulement après l'engagement du TCR. (Chemnitz et al., 2004).

PD-1 peut aussi réguler négativement la phosphorylation d'Akt en agissant indirectement sur la PI3K. Comme attendu, il a aussi un effet négatif sur l'anti apoptotique Bcl-xL normalement surexprimé quand la voie PI3K en aval de CD28 se met en place. Une mutation du domaine ITSM de PD-1 annule la capacité de PD-1 à bloquer l'induction de l'anti-apoptotique Bcl-xL (Parry et al., 2005).

PD-1 peut donc agir négativement sur la signalisation en recrutant directement des phosphatases mais aussi au niveau du cycle cellulaire en bloquant la cellule T avant son passage en phase G₁, qui survient lors de la prolifération.

5. SIGNAUX SANS ANTIGÈNES SPÉCIFIQUES

Il a été montré que même si un LT n'est pas activé suite à des contacts avec des CPA non chargées en peptides de haute affinité, il peut collecter des informations. Ces informations peuvent générer des signaux de survie.

En 2001, mon équipe a montré que les LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs peuvent faire, à court terme, des contacts avec des CD non chargées en antigènes spécifiques. Il y a alors un recrutement de la PKC θ au niveau de la zone de contact ainsi que CD3, CD4, CD8 et CD45. Les tyrosines phosphorylées s'accumulent également à ce pôle tandis que CD43 se retrouve exclu. Un signal calcique (plus fréquent dans les LT CD4⁺) peut aussi être détecté dans ces cellules après le contact (Revy et al., 2001). A plus long terme : Ces cellules sont capables de survivre et même de proliférer en présence de CD non chargées en antigène spécifique (Feuillet et al., 2005).

Quelles sont les molécules impliquées dans cette survie conférée par les CD ? Le CMH représentait le premier candidat. Vincent Feuillet, étudiant en thèse en 2005 au laboratoire, a montré que des LT CD4⁺ mis en co-culture avec des CD déficientes en CMH ont une survie réduite de moitié (Feuillet et al., 2005).

Les signaux d'interaction apportés par CD28 et ICAM-1 sont également impliqués puisqu'en bloquant les interactions entre la molécule de co-stimulation CD28 avec son ligand B7 (exprimé sur les CD) et l'intégrine LFA-1 avec son ligand ICAM-1 (exprimé sur les CD), les signaux de survie sont aussi réduits de moitié. Cette étude a en fait permis de mettre au jour l'effet du CMH comme un amplificateur du signal de survie apporté par B7 et ICAM-1 à la surface des CD. Dans cette étude, il est important de préciser que les auteurs n'ont pas utilisé d'antigènes spécifiques ou de super-antigène (Feuillet et al., 2005).

Les cytokines secrétées par les CD ne semblent pas essentielles dans ce contexte de survie puisqu'un blocage par des anticorps anti IL-7, IL-4 ou une inhibition des récepteurs aux chimiokines (CXCR4 et CCR7) n'entraînent pas d'altérations des signaux de survie. Les surnageants de CD ne sont pas non plus suffisants pour induire la survie des LT. De façon surprenante, les cellules T peuvent survivre *in vitro*, exposées à une forte concentration d'IL-7 qui reste cependant éloignée de la situation physiologique (Feuillet et al., 2005).

Quelles sont les voies de signalisation mises en jeu dans cette survie ? Les voies de signalisation sous-jacentes à ces interactions passent par l'activation des Src kinases puisque l'inhibition de celles-ci entraîne une réduction drastique de la survie permise par les CD. Dans une situation où le CMH est présent à la surface des CD, les domaines ITAM des chaînes CD3 se retrouvent phosphorylés. Cette phosphorylation pourrait être une condition pour l'activation des Src kinases. Elle n'est en revanche pas indispensable pour la survie des LT sans antigène puisqu'en présence d'IL-7 seule et à haute concentration, les LT peuvent survivre et les chaînes du CD3 ne sont pas phosphorylées dans ce contexte.

Il est intéressant de noter que si les interactions TCR-CMH, CD28-B7 et LFA-1-ICAM1 sont bloquées, une petite proportion de LT peut quand même survivre en présence des CD ce qui nous amène à penser qu'il doit exister d'autres signaux de survie délivrés par la CD et captés par le LT (Feuillet et al., 2005).

En conclusion, le signal TCR additionné aux signaux de co-stimulation contribue, dans un contexte sans antigène agoniste, à la survie des cellules T.

III. CARACTÉRISTIQUES MORPHOLOGIQUES DES INTERACTIONS ENTRE LT ET CPA

1. DÉCOUVERTE ET PROPRIÉTÉS DES INTERACTIONS ENTRE LT ET CPA

Le premier concept de coopération directe entre les cellules du système immunitaire remonte à 1966. L'équipe de R. Faser Triplett a démontré que pour observer la production d'anticorps contre des globules rouges de moutons, dans une souris irradiée, il fallait lui injecter à la fois des cellules d'origine thymique et d'autres provenant de la moelle osseuse. Bien que la nature de cette interaction soit restée totalement « obscure », selon leur mot, ils ont appelé ce phénomène le « synergisme thymus-moelle osseuse » (Claman et al., 1966). L'analogie avec la synapse neuronale pour parler de l'interaction entre un lymphocyte T et une CPA est ensuite faite pour la première fois en 1984 par NA. Norcross (Norcross, 1984).

Utilisé pour la première fois en 1897 pour caractériser les interactions cellulaires entre neurones dans le système nerveux, le terme de synapse a été repris par les immunologistes, près d'un siècle plus tard, pour décrire les interactions stables observées entre un lymphocyte T et une cellule présentatrice d'antigène (Grakoui et al., 1999). En 2003, les virologistes ont eux aussi emprunté ce terme pour la « synapse virologique » qui désigne la structure responsable de la transmission virale de cellule à cellule (Igakura et al., 2003)(McDonald et al., 2003)(Jolly, 2004). En 2011, la notion de « synapse phagocytaire » apparaît dans la littérature pour désigner l'interaction entre un phagocyte et la cellule pathogène qu'elle s'apprête à phagocyter (Goodridge et al., 2011) (voir Encart n° 2).

La synapse immunologique (SI) a, depuis, été disséquée sous de nombreux angles grâce à l'avancée des techniques de microscopie. Il n'est pas possible de parler d'une synapse immunologique unique. Selon le type de lymphocyte, leur état de maturation, leur partenaire, la quantité d'antigène présentée et le lieu où l'interaction prend place, les lymphocytes T peuvent établir différents types de synapses. Au sein d'une même interaction entre une cellule T et une CPA donnée, la synapse est même dynamique. Il est alors important lorsqu'on évoque une synapse immunologique, de préciser les protagonistes et de situer spatialement et cinétiquement le contexte afin d'éviter toute confusion.

M. Krummel et ses collègues ont proposé dans une revue récente de diviser les synapses en deux grandes catégories, selon l'état d'activation des LT. Les synapses « primaires » font référence à celles qui sont observées entre un LT naïf et une CPA professionnelle alors que les synapses « secondaires » s'observent une fois que les LT ont été activés et fournissent de l'aide à d'autres cellules ou exercent leur rôle effecteur (Gérard et al., 2013).

Quelle que soit la synapse immunologique observée, celle-ci peut être définie par quatre caractéristiques.

- Elle est éphémère. Elle ne dure que quelques secondes à quelques heures à l'issue desquelles les cellules finissent toujours pas se séparer.
- Les signaux générés et les éventuelles sécrétions y prennent place d'une manière polarisée.

- La zone d'apposition entre les deux membranes est composée de domaines de signalisation avec des jonctions plus lâches et de domaines d'adhésion avec des jonctions plus serrées.
- C'est une plateforme pour l'agrégation de complexes de récepteurs et de domaines lipidiques. Des micro-clusters peuvent s'assembler pour former des complexes plus larges ou « signalosome » (Gérard et al., 2013).

La synapse neurologique

Les synapses neurologiques se forment, dans le système nerveux périphérique entre un neurone et une cellule musculaire par exemple et dans le système nerveux central entre deux neurones. La fente synaptique est très étroite et peut aller de 15 à 40 nm selon la cellule post-synaptique. Pour les fentes synaptiques les plus étroites, les deux cellules sont en contact direct grâce à des interactions homophiliques (mêmes molécules) ou hétérophiliques (molécules différentes). La libération d'un neurotransmetteur dans la fente synaptique provoque l'activation de récepteurs ionotropes et métabotropes. Les premiers sont des canaux qui vont s'ouvrir en quelques micro-secondes pour laisser entrer ou sortir des ions (comme K^+ et Cl^-) et ainsi faire varier la concentration ionique intracellulaire. Les seconds sont couplés à des protéines G et vont transduire un signal dans la cellule post-synaptique.

La synapse virologique et infectieuse

Certains virus comme le VIH-1 (virus d'immunodéficience humaine de type 1), HTLV-1 (*Human T cell lymphoma virus-1*) et HSV (herpes simplex virus) ont dérouté des composants de la synapse immunologique pour former une structure similaire nommée « synapse virologique » ou « synapse infectieuse ». La synapse infectieuse se définit comme une jonction à travers laquelle un virus porté simplement à la surface d'une cellule non infectée, telle qu'une CD, est transféré et infecte une cellule T CD4⁺ non infectée (McDonald et al., 2003). La synapse virologique se définit comme la jonction qui permet le transfert de virus d'une cellule infectée à une cellule T non infectée (Igakura et al., 2003)(Jolly, 2004).

La synapse immune des Natural killers

Les NK (*natural killers*), pour établir des contacts avec leur cellule cible, utilisent leur récepteur KIR (*killer Ig-like receptors*). Celui-ci induit un regroupement de son ligand, HLA-C à la surface de la cellule cible. A la zone de contact, les complexes KIR/HLA-C encerclent par un anneau, une zone centrale composée des complexes d'adhésion LFA-1/ICAM-1. Cette synapse de NK, avec un centre chargé en molécules d'adhésion et un anneau composé de molécules de signalisation, a une organisation inverse à celle de la synapse immunologique mature de type monocentrique. Cette structure qui peut rester en place pendant 20 minutes est dépendante de la présence de cations divalents mais indépendante des cytosquelettes d'actine et de microtubules (Davis et al., 1999).

La synapse phagocytaire

Les macrophages ont la capacité de distinguer un ligand soluble d'un ligand présent à la surface d'un micro-organisme. Cette reconnaissance est permise par la protéine Dectin-1, qui en reconnaissant des β -glucans, présents à la surface de certaines levures par exemple, permet la phagocytose de ces dernières. Ce mécanisme requiert une réorganisation des protéines membranaires et une polymérisation de l'actine qui mènent à la formation d'une synapse phagocytaire. Durant ce processus, comme pour la synapse immunologique, des phosphatases sont exclues du site de liaison (Goodridge et al., 2011).

2. ARCHITECTURE DES SYNAPSES IMMUNOLOGIQUES ET DESTINS CELLULAIRES

Selon les protagonistes cellulaires, les synapses peuvent adopter plusieurs formes. Leur architecture a été classée selon trois types : monocentrique, multifocale et dynamique. Cette dernière est néanmoins particulière et peut en fait être observée en même temps que la synapse monocentrique et multifocale. Ce point sera discuté plus loin.

La figure suivante permet d'avoir un aperçu des conditions d'observation *in vitro* des différentes synapse.

Type de synapse	LT	CPA
Monocentrique	CD4 ⁺ naïf	Lymphocyte B
		CPA splénique
		Bicouche lipidique
	CD4 ⁺ activé	Lymphocyte B
		Bicouche lipidique
	CD4 ⁺ activé T _H 1	Bicouche lipidique
		Fibroblaste
	CD8 ⁺ CTL	Cellule cible
		Bicouche lipidique
Multifocale	Thymocyte DP	Cellule stromale thymique
		Bicouche lipidique
	CD4 ⁺ et CD8 ⁺ naïfs	CD
	CD4 ⁺ naïf	Fibroblaste
	CD4 ⁺ activé T _H 2	CPA splénique
		Bicouche lipidique
		Fibroblaste
	CD4 ⁺ et CD8 ⁺ activés	CD
Dynamique	CD4 ⁺ naïf	Bicouche lipidique
	CD4 ⁺ activé	Fibroblaste
		Bicouche lipidique

Figure 12: Conditions d'observation *in vitro* des différentes synapses.

Les carrés verts représentent les cellules T immatures ou naïves et les carrés bleus les cellules T activées. Les carrés oranges et jaunes représentent les CPA les plus physiologiques, les gris et blancs, les CPA artificielles. Adapté de (Thauland and Parker, 2010).

Dans ce chapitre, je décrirai les différentes formes que peuvent prendre les synapses immunologiques et leur rôle sur le destin de la cellule T.

A. LA SYNAPSE MONOCENTRIQUE MATURE

Premières mises en évidence

Les premières visualisations par immunofluorescence de la synapse immunologique, ont montré une structure monocentrique avec au centre un cSMAC (*central supramolecular activation cluster*) où sont ségréguées les TCR et des protéines associées à sa signalisation et en périphérie, un anneau, le pSMAC (*peripheral supramolecular activation cluster*), où sont ségréguées des protéines d'adhésion comme LFA-1 (Monks et al., 1998).

Pour pallier à la difficulté d'observer la mise en place de cette structure en vidéo-microscopie, l'équipe de M. Dustin a utilisé non pas des CPA mais des bicouches lipidiques planes dans lesquelles ont été ancrées des CMH et ICAM-1 fluorescents par des motifs GPI (glycophosphatidylinositol). Ces surfaces miment la surface d'une CPA et permettent aux molécules ancrées de diffuser dans la bicouche lipidique. Cet outil a permis de confirmer l'organisation monocentrique en cSMAC/pSMAC au niveau de la lamelle et de montrer qu'elle se met en place en 30 à 60 min (Figure 13A). Le terme de « synapse immunologique », introduit à ce moment-là, est depuis rentré dans le vocabulaire des immunologistes (Grakoui et al., 1999).

Condition d'observation et composition

La synapse monocentrique est la synapse la plus décrite dans la littérature à l'évocation du terme « synapse immunologique ». Il n'est pourtant possible de l'observer, *in vitro*, que dans certaines conditions et à des temps tardifs après l'interaction, ce qui lui a aussi valu le nom de « synapse mature ».

La cinétique de sa formation se déroule de la manière suivante :

- Quand la cellule s'arrête, les protéines de signalisation et d'adhésion convergent vers la zone de contact et peuvent dès lors s'organiser pour former une synapse. Cette synapse qualifiée d'immature peut être multifocale, c'est à dire organisée avec de nombreux clusters de signalisation, ou monocentrique avec une organisation inverse à la synapse mature (Grakoui et al., 1999) (Figure 13B). Il est important de noter que c'est lors de la formation de la synapse immature que l'activation est initiée et que la signalisation positive atteint un pic. Par FRET, il a été montré que le rapprochement de CD4 des chaînes du CD3 survenait d'ailleurs dans cette fenêtre de temps (Zal et al., 2002). On y observe, dans un même temps, un recrutement de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation du lymphocyte T (Lck, ZAP-70, LAT, PI3K, PLC- γ) qui vont se réunir autour du complexe TCR/CD3 (Monks et al., 1998) (Grakoui et al., 1999).
- Cinq à trente minutes plus tard, et dans certains cas, la synapse peut évoluer vers une organisation monocentrique, aussi appelée « en œil de bœuf ». Cette synapse mature se caractérise par un anneau composé principalement de LFA-1 et de taline, le pSMAC, qui entoure un centre où sont ségrégués des complexes TCR/CD3, le cSMAC (Figure 13B). Une autre zone, le dSMAC (*distal supramolecular activation cluster*), caractérisée par la présence de CD45 et d'actine sous-corticale forme aussi un anneau autour du pSMAC. Cette synapse est le lieu privilégié pour la mise en place

d'une régulation négative du signal TCR (Monks et al., 1998) (Grakoui et al., 1999) (Friedl et al., 2005) (voir chapitre ci-dessous).

La Figure 13 ci-dessous illustre sa composition et sa cinétique.

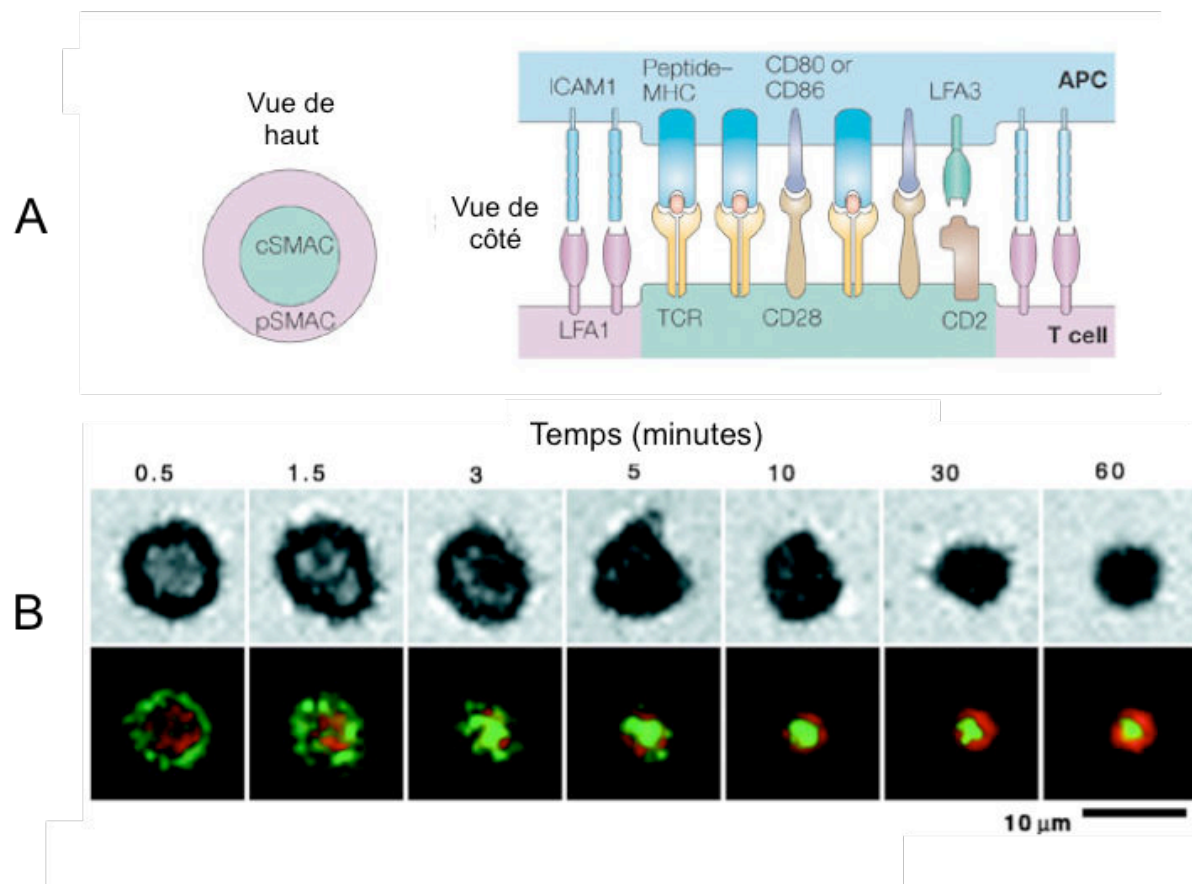


Figure 13: Structure et cinétique de la synapse monocentrique mature

(A) représentation schématique de la synapse monocentrique mature avec un centre cSMAC composé des molécules de signalisation TCR et CD28 entouré d'un anneau pSMAC composé d'intégrines assurant l'adhésion lors du contact. Adapté de (Friedl et al., 2005). (B) Cinétique de la formation de la synapse monocentrique mature obtenue en vidéo-microscopie avec des cellules T murines 2B4 sur des bicouches lipidiques recouvertes d'ICAM1 couplés à de l'Oregon Green (vert) et de pCMH chargés en antigènes couplés à la Cy5 (rouge). Moins d'une minute après le contact, des spots de CMH se localisent en périphérie de la synapse alors que les spots d'ICAM-1 se regroupent au centre. Il s'agit d'une synapse monocentrique immature. Entre 3 et 10 minutes, la structure s'apparente à une synapse multifocale.

Plus de 30 minutes après le contact l'organisation s'inverse par rapport au départ pour former une synapse monocentrique mature. Extrait de (Grakoui et al., 1999).

La synapse monocentrique mature, n'a été observée, qu'*in vitro*, dans les LT CD4⁺ naïfs avec des lymphocytes B issus de lymphomes, à des concentrations élevées en antigène ou sur des bicouches lipidiques (Trautmann and Valitutti, 2003). L'organisation de cette structure pourrait s'expliquer par un mécanisme physique. La densité importante de pCMH sur les bicouches lipidiques permettrait de recruter progressivement les TCR qui diffusent latéralement dans la membrane du LT. Mécaniquement ces TCR pourraient alors se retrouver piégés d'abord en périphérie puis ensuite à la zone de contact lorsque de nouveaux TCR arrivent en périphérie (Trautmann, 2005).

La synapse qui permet la sécrétion polarisée de cytokines ou de molécules cytotoxiques vers une cellule cible est également une synapse de type monocentrique. Son rôle dans la sécrétion sera décrit un peu plus loin. Elle s'observe dans les LT CD4⁺ activés en contact avec des LB naïfs et entre un lymphocyte T cytotoxique et sa cible. Cette synapse monocentrique dite sécrétrice ressemble à la synapse monocentrique mature avec un cSMAC (composé de CD8, PKC- θ , LAT) au centre d'un anneau pSMAC (avec LFA-1, CD2) et un autre dSMAC. La différence réside dans le fait qu'une zone sécrétrice prend place au centre, adjacente au cSMAC (voir Figure 14).

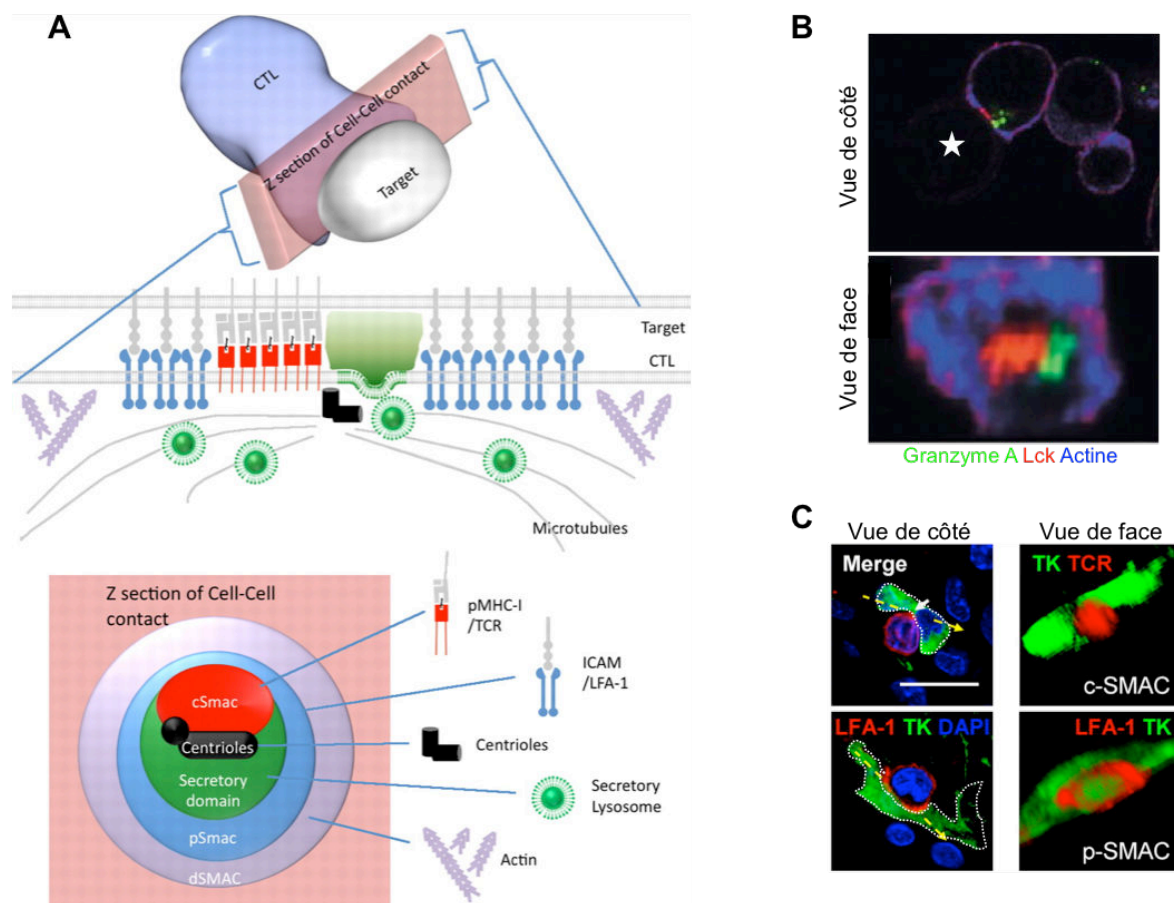


Figure 14: Organisation de la synapse sécrétrice entre un CTL et sa cible.

(A) Schéma d'organisation d'une synapse sécrétrice. Le cSMAC est apposé à côté d'une zone sécrétrice où le MTOC est ancré. La zone sécrétrice est riche en vésicules destinées à être exocytées. Les microtubules formés à partir du MTOC forment un réseau très dense au niveau de cette espace. Extrait de (Griffiths et al., 2010). (B) Observation de synapse sécrétrice par immunofluorescence *in vitro* entre des CTL et des cellules cibles P815 murines. L'image du haut représente le conjugué de côté et celle du bas de face. L'étoile indique la présence de la cellule cible non représentée. Lck est marqué en rouge, l'actine en bleu et le granzyme A en vert. Les granules lytiques sont présentes au centre à côté du cSMAC formé par Lck en rouge. Le dSMAC, marqué ici avec l'actine entoure cette zone. Extrait de (Stinchcombe et al., 2001). (C) Observation de synapse sécrétrice par immunofluorescence *in vivo* entre des CTL et des astrocytes infectés par un virus. Les pointillés délimitent la cellule cible. Les marquages sont indiqués dans l'image. TK est un rapporteur pour les cellules infectées. Le TCR est recruté au centre de la synapse alors que LFA-1 est maintenu au centre. La flèche jaune dans les colonnes de gauche indique le plan qui a été sélectionné pour la vue de face dans la colonne de droite. Barre d'échelle= 25 μ m. Adapté de (Barcia et al., 2006).

C'est par cette zone sécrétrice que les granules et les vésicules sont exocytées (Bossi et al., 2002). Cette synapse qui ne dure que quelques minutes (Griffiths et al., 2010) a déjà été observée *in vivo* entre des LT CD8⁺ et des astrocytes infectés par des virus, dans le cerveau de rat (Barcia et al., 2006).

Les conséquences de la formation des synapses monocentriques sur l'activation et la sécrétion seront abordées dans les deux chapitres suivants.

La synapse monocentrique mature et l'activation

Étant donné que les événements de signalisation (flux calcique, activité des kinases, phosphorylations) surviennent directement au niveau de la zone de contact, la synapse monocentrique mature fut au début considérée comme un prérequis pour l'activation en permettant une concentration des signaux (Grakoui et al., 1999).

Bousculant cette idée, une étude a montré que l'activité des tyrosines kinases ZAP-70 et Lck et la détection des tyrosines phosphorylées étaient drastiquement diminuées dans le cSMAC au moment où celui-ci commençait à apparaître (Lee et al., 2002).

Avec l'arrivée de la microscopie par TIRF dans les laboratoires (voir Encart n° 3), de nombreuses études se sont focalisées sur les modèles des bicouches lipidiques. Il est en effet possible de suivre par cette technique, et avec une grande résolution, l'état d'activation des protéines au niveau de la zone de contact avec un support solide.

Encart n° 3: La microscopie par TIRF (*Total Internal Reflection fluorescence Microscopy*)

Cette méthode de microscopie par fluorescence permet de détecter des molécules fluorescentes qui se situent entre 100 à 200 nm de l'interface entre une cellule et son support. Ces derniers peuvent être inertes comme des lamelles en verre recouvertes de protéines ou dynamiques comme des bicouches lipidiques dans lesquelles ont été ancrées des protéines par une queue GPI (phosphatidylinositol glycosylée). Cette méthode confère une bonne résolution latérale et axiale à l'interface et donne la possibilité d'observer les mouvements de molécules au niveau de l'interface, à l'échelle du nanomètre.

Le principe repose sur l'excitation des fluorophores sur une très faible profondeur à l'interface support/cellule. L'excitation est permise grâce à la formation d'une onde « évanescente ». Cette onde est émise à un angle précis (angle critique) quand la lumière incidente est totalement réfléchi. Ce phénomène est appelé la réflexion totale interne. Plus les fluorophores sont proches du support, plus l'intensité d'excitation augmente.

Au stade de synapse mature, le statut de phosphorylation des micro-clusters dans le cSMAC est très bas contrairement à celui de ceux qui se forment dans le pSMAC et qui regroupent le TCR et les protéines SLP-76, ZAP-70, Lck ou LAT dans leur état activé (Campi et al., 2005)(Yokosuka et al., 2005). Cela indique que la mise en place de la cascade de signalisation ne se met pas en place au centre mais en périphérie.

La phosphatase CD45, régulateur négatif, est exclue de ces microclusters. Elle est en revanche retrouvée au niveau du cSMAC quand celui-ci se forme lors de la maturation de la synapse. Le cSMAC est également riche en LBPA (acide lysobiphosphatidique), un lipide impliqué dans l'adressage des protéines ubiquitinyliées vers la dégradation. Après la convergence des TCR vers le cSMAC, ces derniers disparaissent de la surface et sont dégradés dans le cytoplasme (Varma et al., 2006).

En imposant des contraintes géométriques aux mouvements des microclusters, grâce à des supports dans lesquels des barrières en relief ont été incorporées, il est possible d'empêcher leur relocalisation dans le cSMAC. Ces modèles forcent en fait la formation de synapse multifocale. Dans ce cas-là, le signal TCR est prolongé (Mossman et al., 2005).

Toutes ces données montrent que le cSMAC des synapses monocentriques matures n'est impliqué non pas dans l'initiation mais la terminaison des signaux. Ces observations, obtenues avec des bicouches lipidiques, ont toutes été menées dans des conditions expérimentales éloignées des situations *in vivo*. Elles ont cependant l'avantage de décrire avec précisions la composition et l'état d'activation des microclusters.

Rôle de la synapse monocentrique dans la sécrétion polarisée

Les lymphocytes T_H et les CTL sont capables d'exociter des facteurs solubles vers un LB ou une cellule cible. Les lymphocytes CD4⁺ activés contiennent des vésicules chargées en IL-2, IL-4, IL-5 et IFN- γ . Ces cytokines contribuent à activer les lymphocytes B. Les CTL activés ont des granules contenant des granzymes et de la perforine. Les premières mènent la cellule cible vers l'apoptose, en interagissant avec les caspases qui régulent ce processus. La seconde perce sa membrane cellulaire pour permettre l'entrée des granzymes. FasL, présent dans des vésicules destinées à être exocytées, provoque aussi une apoptose dépendante des caspases (Bossi et al., 2002)(Friedl et al., 2005).

In vivo, dans des LT CD8⁺, une étude, a montré à l'aide d'images de très bonne résolution que des synapses monocentriques matures précédaient la lyse de cellules cibles infectées (Barcia et al., 2006). Dans des CD4⁺ activés, des vésicules intracellulaires chargées en cytokines se polarisent au niveau de la jonction avec la cellule B (Kupfer et al., 1991)(Reichert et al., 2001). Les composés exocytés (cytokines ou molécules cytotoxiques) sont relargués précisément dans la fente synaptique où leur concentration locale augmente rapidement.

Comme le pSMAC encercle le champ de sécrétion, de nombreuses études ont formulé l'hypothèse que cette élévation soudaine de la concentration en composés exocytés pourrait être due à la ceinture de molécules d'adhésion qui formeraient un joint autour de la zone de sécrétion (Friedl et al., 2005). Nous allons voir ici que cette hypothèse est peu crédible.

Premièrement, des études ont montré que des grosses molécules solubles, comme des anticorps par exemple, pouvaient accéder facilement à la zone de contact quand la synapse sécrétrice était déjà en place (Huppa et al., 2003). Ensuite, certaines études ont montré que la libération des granules cytotoxiques dans des CTL à la zone de contact peut survenir avant même que la synapse monocentrique mature soit formée, dans des conditions avec une faible concentration en antigènes (Faroudi et al., 2003a)(Purbhoo et al., 2004). Il existe aussi un décalage dans le seuil de sensibilité du TCR pour ces deux événements. Seuls

trois CMH à la surface de la CPA peuvent entraîner la mort de la cellule cible par une CTL alors que dix sont nécessaires pour former une synapse mature (Purbhoo et al., 2004). Enfin, les granules peuvent être exocytés au niveau du pSMAC et pas seulement dans la zone sécrétrice du cSMAC (Beal et al., 2009).

En conclusion, la synapse ne dispose pas de barrière physique pour concentrer les vésicules exocytées par des LT CD4⁺ ou CD8⁺ activés. La sécrétion peut donc avoir lieu à travers une synapse différente de la monocentrique dont la structure n'a pas encore été identifiée (Faroudi et al., 2003a) ou monocentrique, en présence d'une stimulation assez forte, comme préalablement montrée *in vivo* (Barcia et al., 2006). Les mécanismes qui entraînent une sécrétion dirigée n'ont pas encore été élucidés.

Bien que non impliqué dans l'effet barrière du pSMAC, LFA-1 semble jouer un rôle important dans l'induction de la mort des cellules cibles *in vitro*. En présence d'anticorps bloquant son interaction avec ICAM-1, les cellules cibles des LT CD8⁺ sont moins sensibles à l'effet cytotoxique (Faroudi et al., 2003a)(Anikeeva et al., 2005). L'établissement de zones d'apposition très étroites par les molécules d'adhésion serait probablement suffisant pour cibler spécifiquement la cellule cible.

Dans les CTL, un des mécanismes pourrait s'expliquer, en plus, par une relative instabilité des perforines. Celles-ci sont très vite dégradées si elles n'ont pas atteint la surface de la CPA, empêchant ainsi les dommages collatéraux sur les cellules environnantes (Pipkin and Lieberman, 2007)(Sanderson et al., 2012). Les lymphocytes T CD8⁺, premiers exposés à ces doses mortelles, peuvent se protéger en exprimant à leur surface de la cathepsine B qui clive la perforine issue de la dégranulation (Balaji et al., 2002).

L'idée que la dose de cytokines sécrétée par les CD4⁺ est uniquement réservée à la cellule cible a été bousculée récemment par deux études qui montrent que les contenus des vésicules exocytées à la SI peuvent avoir des effets au-delà de la cellule cible. L'IFN γ par exemple peut diffuser jusqu'à 80 μ m autour, à partir de la synapse, et stimuler les cellules aux alentours (Sanderson et al., 2012)(Müller et al., 2012). Les cellules CD4⁺ peuvent ainsi, par ce mécanisme, offrir une protection dans un champ plus large que celui du conjugué. Cet effet est aussi permis par la longue durée de vie de ces cytokines.

La synapse monocentrique permet donc aux cellules T CD4⁺ et CD8⁺, dans certaines conditions de stimulation, de privilégier la sécrétion de molécules solubles vers une cellule cible, sans toutefois conférer un joint parfaitement étanche. La persistance d'une synapse sécrétrice, entre une cellule T naïve et une CPA professionnelle peut avoir des bénéfices pour les deux cellules. En effet, les signaux peuvent être bidirectionnels et un lymphocyte B peut bénéficier des cytokines produites par un LT, quelques heures après l'avoir activé lui-même (Trautmann et al., 2003)(Duchez et al., 2011).

B. LA SYNAPSE MULTIFOCAL

Structure et composition

Bien que de nombreuses études se soient focalisées sur les synapses monocentriques, il existe de nombreux exemples, dans la littérature, de synapses qui ne présentent pas d'organisation du type cSMAC/pSMAC.

Cette synapse est caractérisée par des zones d'apposition étroites (composées de clusters de molécules d'adhésion) alternant avec des zones d'appositions lâches (composées de complexes TCR-pCMH et de molécules de signalisation phosphorylées) (Richie et al., 2002)(Hailman et al., 2002).

Des microclusters, où les molécules de signalisation ZAP-70 et SLP76 commencent à interagir, sont générés en permanence en périphérie de la zone de contact quand la cellule commence à ramper sur une bicouche lipidique. Les interactions entre les molécules sont rompues quand les microclusters arrivent au centre de la zone de contact (Yokosuka et al., 2005). Ces petites structures sont en fait les unités de signalisations transitoires qui composent ces synapses

Des microclusters de TCR/CD3 peuvent être formés indépendamment des Src kinases et de ZAP-70 (Yokosuka et al., 2005) (Blanchard et al., 2002). Ces kinases sont cependant essentielles pour leur mobilité. Le cytosquelette d'actine joue également un rôle dans leur déplacement puisqu'un blocage de la polymérisation de l'actine avec la latrunculine A empêche la cellule de générer de nouveaux microclusters et le blocage du mouvement de ceux qui sont présents à la synapse (Varma et al., 2006)(Yokosuka et al., 2005). Une étude réalisée sur des bicouches lipidiques, tirant partie de la microscopie à haute résolution (voir Encart n° 4), a montré que leur établissement initial au niveau de la zone de contact dépendait des protrusions émises par la CPA qui vont rencontrer en premier le LT (Sherman et al., 2011).

Il existe en fait un sous-niveau d'organisation pour les microclusters. Des monomères, dimères ou nanoclusters de protéines qui se forment majoritairement après la stimulation s'assemblent entre eux, aux points de contacts pour former les microclusters (voir Figure 15B). Les nanoclusters, unités de signalisation des microclusters, voient leur taille augmenter après la stimulation (Sherman et al., 2013)(Sherman et al., 2011).

Comment ces nanoclusters se forment ? Leur formation est régulée en partie par le trafic vésiculaire qui sera approfondi au chapitre IV.3.A. La cinétique et la régulation de ces voies ont fait l'objet d'une étude récente qui montre que la protéine échafaudage LAT forme avec SLP-76 des nano-clusters, appelés aussi « nano-territoires », suite à son recrutement à la SI à partir de vésicules qui ont fusionné. La fusion, l'organisation et l'activité de ces nanoclusters sont régulées par le recrutement antérieur de Lck à la membrane (Soares et al., 2013).

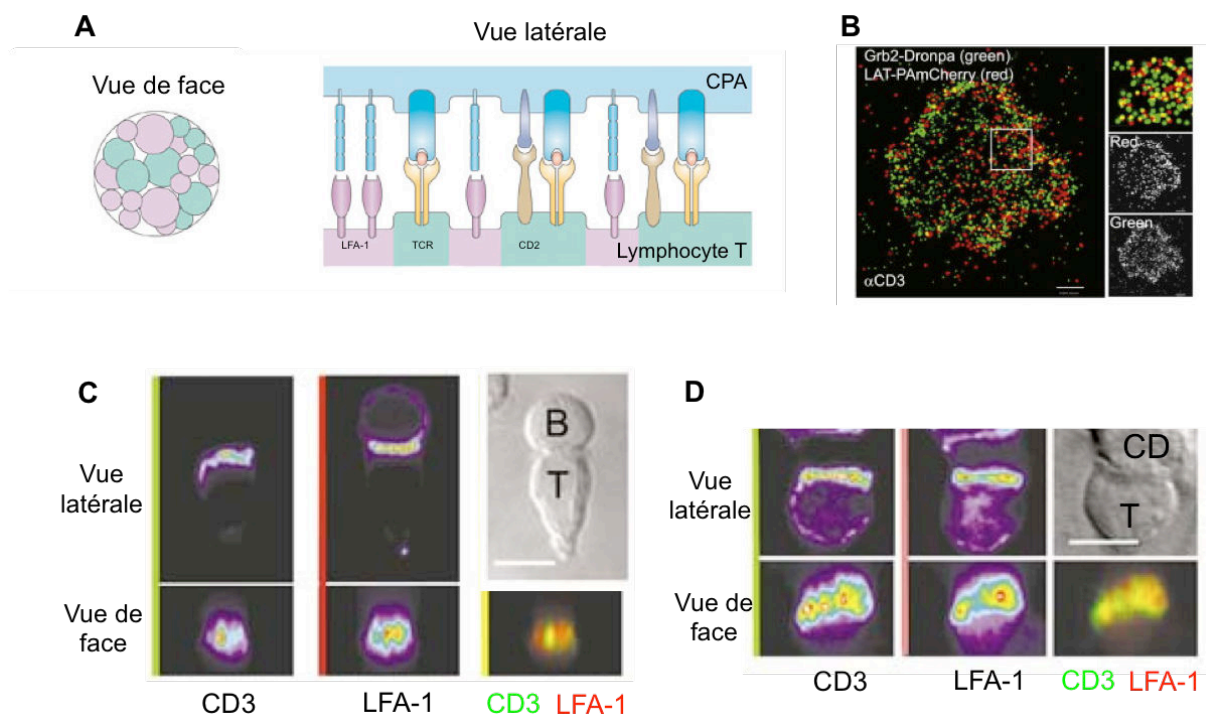


Figure 15: Organisation de la synapse multifocale

(A) Représentation schématique d'une synapse multifocale avec des zones d'apposition étroites intercalées entre d'autres plus lâches (Friedl et al., 2005). (B) Synapse multifocale obtenue avec une cellule Jurkat déposée pendant 3 min sur une surface recouverte d'anticorps anti-CD3. Images obtenues par la méthode PALM avec les marqueurs: LAT couplé à PamCherry (vert sur l'image) et Grb2 couplé à Dronpa (rouge sur l'image). Lors d'une stimulation par CD3, des nanoclusters de LAT interagissent avec d'autres de Grb2. La colocalisation de ces deux marqueurs est visible en jaune (Sherman et al., 2011). Le marquage LFA-1 n'est pas présent dans cette image mais les nanoclusters se positionnent ici dans la totalité de la zone d'interaction. (C,D) Immunofluorescence de synapses multifocales vue de face et sur le côté entre un lymphocyte T et un lymphocyte B (C) ou une CD (D) à 15 min de contact, temps où les synapse monocentriques sont normalement observées. Les marquages sont indiqués sous les images. CD3 et LFA-1 ne montrent pas de localisation centrale et périphérique comme pour les synapses monocentriques (Brossard et al., 2005). La structure précise des synapses multifocales entre deux cellules est difficile à observer car la zone d'interaction n'est pas parfaitement plane comme celle obtenue avec des lamelles recouvertes d'anticorps ou des bicouches lipidiques.

Conditions d'observations

Les cellules T immatures double positives (DP), ne peuvent pas former de synapses organisées en cSMAC/pSMAC *in vitro* avec des CPA ou même sur des bicouches lipidiques. L'organisation qui a été observée est de type multifocale. Ce type de synapse s'observe aussi dans des LT T_H2 naïfs en présence de LB naïfs où les clusters de TCR sont moins aptes à migrer vers le centre par rapport à des LT T_H1 . Cette différence doit résider dans le niveau d'expression de CTLA-4 qui est plus important dans les T_H2 . En inhibant son expression dans ces cellules, il est en effet possible d'observer de nouveau des mouvements de clusters de TCR qui convergent vers le centre pour former un cSMAC (Jackman et al., 2007).

Le phénotype de la CPA affecte l'architecture de la synapse. Les CD matures entraînent la formation de SI multifocale dans les LT $CD4^+$ naïfs et activés et $CD8^+$ naïfs (Brossard et al., 2005). La présence de

l'antigène à la surface de la CD n'est pas indispensable pour l'observation de cette structure (Revy et al., 2001). Les CD matures ont la particularité unique de présenter à leur surface des microvilli, très nombreux, qui peuvent atteindre jusqu'à 1,2 μm de long et pourraient être responsable du caractère multifocal de ces synapses. Ces protrusions, générées en présence de LT, permettent en même temps à la cellule d'augmenter considérablement sa surface de contacts (Fisher et al., 2008). Les zones de contacts formées entre les microvilli et les pseudopodes des LT sont les lieux où les microclusters s'assemblent préférentiellement (Sherman et al., 2011).

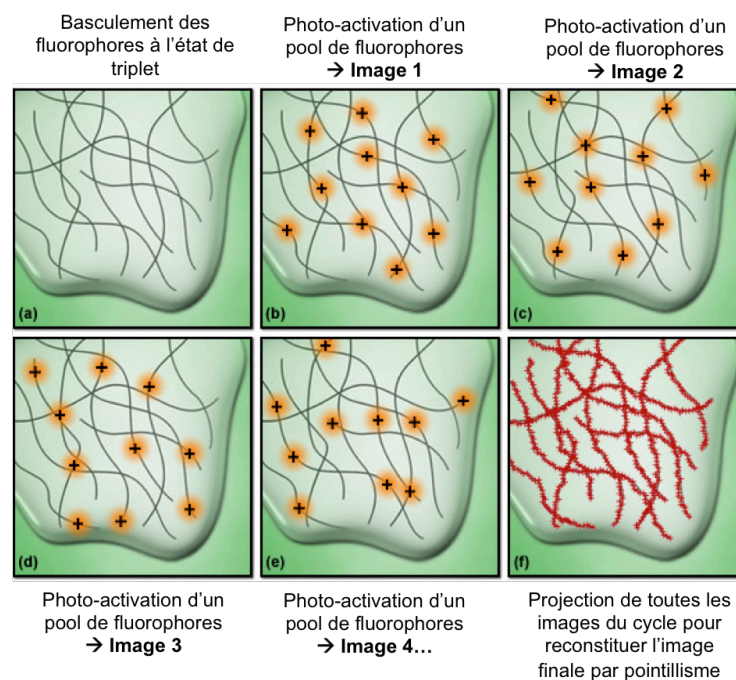
La synapse multifocale a également été observée entre des LT naïfs et des LB issus de lymphomes faiblement chargés en antigène (Cemerski et al., 2008). Étant donné qu'à l'état physiologique, les CPA possèdent, en proportion, peu de CMH avec des antigènes spécifiques à leur surface, la synapse multifocale doit être plus proche de ce qu'il se passe *in vivo* pour l'activation des lymphocytes T (Delon et al., 1998a)(Revy et al., 2001). Une illustration de cette synapse et des exemples retrouvés dans la littérature sont présentés en Figure 15.

L'équipe de M. Krummel a montré que des synapses multifocales pouvaient aussi se former entre deux cellules T activées. Ces interactions homotypiques permettraient aux cellules T de bénéficier de la sécrétion polarisée d'IL-2 entre elles et d'accélérer leur différenciation en cellules effectrices (Sabatos et al., 2008).

Encart n° 4: La microscopie à haute résolution : Le STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*) et le PALM (*photo-activated localization microscopy*)

La microscopie à haute résolution : le PALM (*photo-activated localization microscopy*) et le STORM (*stochastic optical reconstruction microscopy*), élues 'Méthode de l'année 2008' par le journal *Nature Methods*, permettent de visualiser des structures intracellulaires en s'affranchissant des contraintes de la diffraction de la lumière. La résolution obtenue peut atteindre les 10 nm seulement. Cette valeur peut être atteinte grâce au remplacement des tâches de lumière diffractées par des points calculés. Ces techniques peuvent être réalisées à l'aide de lasers puissants qui excitent les fluorochromes jusqu'à les faire passer à l'état de triplet. En d'autres termes, les fluorophores sont bloqués à un niveau d'énergie élevé et 'éteints' temporairement. Le retour à l'état fondamental (niveau d'énergie minimum) est ensuite réalisé grâce à des séries de flashes. A chaque flash, quelques fluorochromes restituent leur énergie au hasard en émettant des photons (clignotement), suivant une loi stochastique. C'est cette caractéristique qui est exploitée afin de localiser des structures à l'échelle de la molécule unique. Les molécules désexcitées atteignent alors un niveau d'énergie où elles ne pourront plus être excitée (*bleaching*). Le taux de clignotement doit être finement contrôlé par l'utilisateur afin d'éviter la superposition de deux fluorophores voisins activés. Un large nombre d'images contenant chacune quelques points, qui symbolisent le clignotement de fluorophores activés, est ainsi collecté et permet de reconstituer une image par pointillisme.

Le PALM peut être réalisé sur cellules vivantes avec des protéines fluorescentes couplées à des protéines d'intérêt alors que le STORM ne peut se faire que sur des cellules immuno-marquées avec des anticorps couplés à des molécules organiques fluorescentes. Dans le cas du PALM, les fluorophores sont suivis pendant un court laps de temps avant d'être 'bleachés'. Cette variante est très intéressante puisqu'elle permet de suivre le mouvement d'une seule protéine isolée pendant une durée déterminée. En reconstituant les mouvements de différentes protéines, il est alors possible de suivre très précisément le mouvement d'un cluster de plusieurs protéines par exemple. Le PALM est permis par l'utilisation de protéines qui ont des propriétés photo-convertibles.



Principe du STORM schématisé (adapté du site Nikon <http://www.microscopyu.com>)

Les microclusters : lieu d'initiation de la signalisation

La dynamique des synapses multifocales est encore en cours d'étude mais l'hypothèse la plus probable serait que ce soit ces micro-assemblages de protéines qui soient responsable de l'initiation de la signalisation. Ces complexes multimoléculaires ont déjà été décrits comme le siège des événements précoces de signalisation (Sherman et al., 2011)(Yokosuka et al., 2005). Leur composition, présentée dans la Figure 16, permet de mieux comprendre comment les premières phosphorylations se mettent en place. La signalisation transitoire par ces petites unités, qui se forment perpétuellement en périphérie puis disparaissent, doit probablement contribuer à alimenter le « compteur » des TCR engagés qui contrôle le seuil d'activation (Valitutti et al., 1995b)(Viola and Lanzavecchia, 1996).

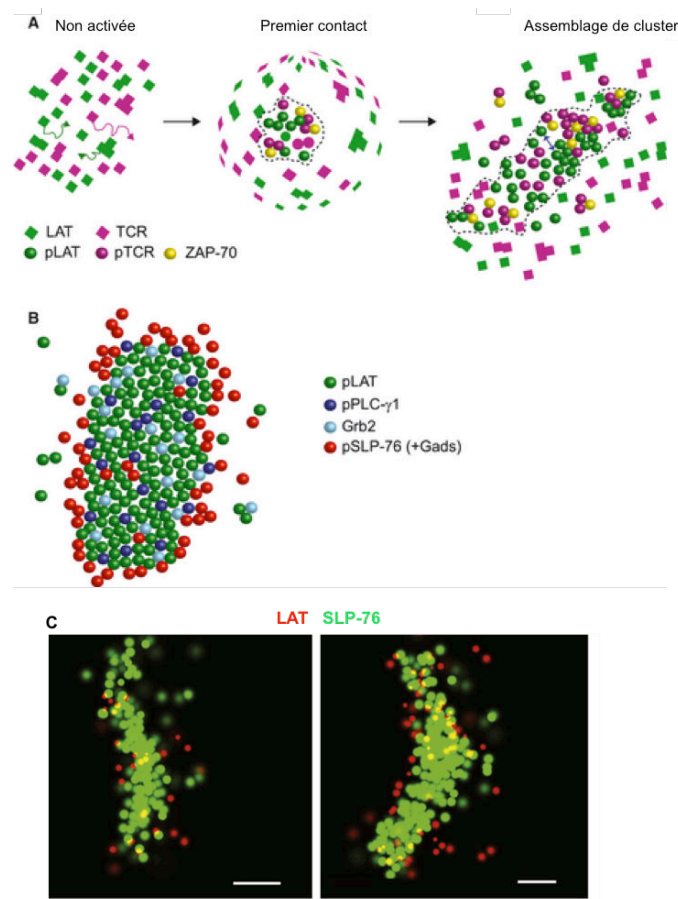


Figure 16: L'activation des cellules T est initiée par des structures dynamiques composées de nanoclusters de signalisation

(A) Représentation schématisée de la formation des microclusters de LAT : Le TCR et LAT résident dans de petits nanoclusters dans les lamellae. Quand un lamella touche une surface stimulatrice, des clusters de signalisation, composés de sous-clusters : les nanoclusters, se forment au point de contact. Les chaînes du TCR phosphorylées recrutent ZAP-70, qui à son tour phosphoryle LAT dans les nanoclusters. LAT recrute ensuite de nombreuses protéines effectrices autour de lui. Quand les lamellae s'étendent à la surface, les nanoclusters restent confinés dans la zone de contact symbolisée par les pointillés. (B) Représentation schématisée d'un cluster de LAT et ses molécules associées. Dans ces grands clusters de LAT, les protéines effectrices Grb2, PLC-γ1 se retrouvent au niveau des nanoclusters de LAT. SLP-76 reste cependant recruté à la périphérie où il est probable qu'il fasse le lien entre cette plateforme et le cytosquelette d'actine. (C) Détails des microclusters de LAT obtenus représentant une organisation avec SLP-76 en périphérie, obtenus sur des lamelles recouvertes d'anticorps anti-CD3 par microscopie PALM. Le vert représente LAT couplé à la Dronpa et le rouge SLP-76 couplé à PAmCherry. (A) et (B) adaptés de (Sherman et al., 2013), (C) extrait de (Sherman et al., 2011).

La formation des nano-clusters de LAT et SLP-76 phosphorylés est importante pour l'activation. Une étude a en effet montré qu'en empêchant leur mise en place en bloquant la fusion de ces protéines à la membrane, les phases tardives de la signalisation étaient altérées (Soares et al., 2013).

C. LA SYNAPSE DYNAMIQUE OU KINAPSE

Structure et conditions d'observation

Le terme de « kinapse » a été introduit pour la première fois en 2008 par M. Dustin qui les a défini comme des synapses en mouvement capables de générer une signalisation (Dustin, 2008). Les synapses dynamiques ou « kinapses » se forment lors des contacts transitoires et présentent une morphologie qui est compatible avec la migration de la cellule à la surface de la CPA.

Quand une cellule T migre à la surface d'une CPA, son corps cellulaire peut être décomposé en trois parties. Le *lamellipodium* (ou *leading edge*), à l'avant de la cellule, est composé d'actine et développe en permanence des pseudopodes qui rampent sur la CPA. Ce pôle est enrichi en récepteurs aux chimiokines, en protéine d'adhésion FAK et en radeaux lipidiques (Mitchell et al., 2002)(Nieto et al., 1997). Le MTOC et le noyau se localisent au centre de la cellule aussi appelé *lamella*. L'uropode, à l'arrière de la cellule, est riche en molécule inhibitrice CD43, et en molécules d'adhésion ICAM-1 et ICAM-3. Le *lamellipodium* est le lieu où est initié la signalisation du TCR et la signalisation calcique environ une minute après la liaison avec la CPA. Aucune structure similaire à la synapse multifocale ou monocentrique n'a été observée à la zone de contact. Les TCR qui sont engagés au *leading edge* sont ensuite libérés vers l'uropode quand la cellule avance (Friedl and Bröcker, 2002). La molécule échafaudage LAT, habituellement retrouvée au niveau des synapses monocentriques et multifocales, n'a pas été détectée au niveau des kinapses *in vivo* (voir Figure 17C) (Azar et al., 2010). La Figure 17 présente une illustration de cette synapse ainsi qu'un exemple d'observation *in vitro* et *in vivo*.

Ces synapses ont été mises en évidence *in vitro*, dans des matrices de gel de collagène en trois dimensions contenant des CD matures, par l'équipe de P. Friedl. Elles se produisent également *in vivo* à l'occasion de deux phases de plusieurs heures de contacts transitoires (Mempel et al., 2004)(Miller et al., 2002)(Azar et al., 2010).

Tout comme la synapse monocentrique et multifocale, sa formation dépend de l'état d'activation du LT et du type d'APC. Les LT fraîchement activés ralentissent et font des kinapses dans le ganglion alors que les LT naïfs ont plutôt tendance à s'arrêter totalement (Azar et al., 2010).

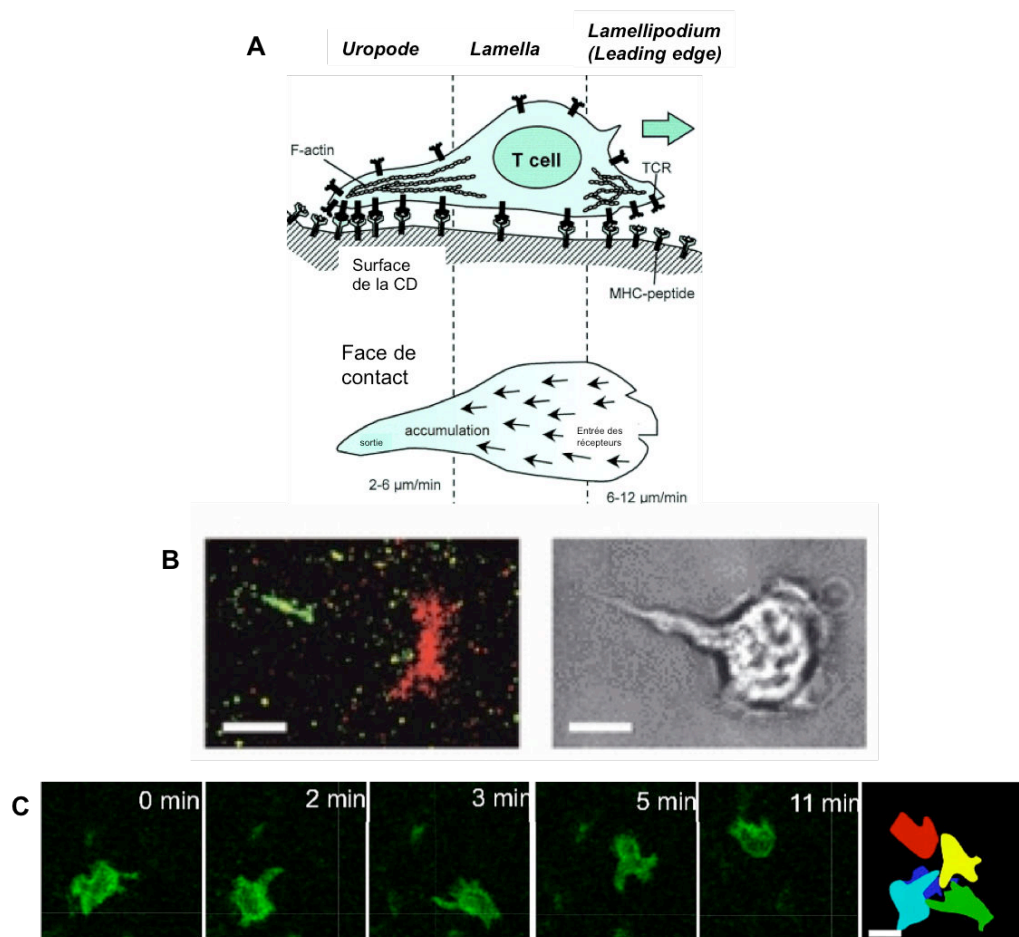


Figure 17: Synapse dynamique ou kinapse.

(A) Représentation schématique de la synapse dynamique. Un pôle migratoire où les TCR sont engagés fait face à un uropode riche en filaments d'actine. Les TCR sont désengagés à cet endroit là au fur et à mesure que la cellule rampe. Le schéma ci-dessous symbolise le mouvement rétrograde des TCR vers l'uropode et indique la vitesse à l'uropode et au *leading edge* qui est deux fois plus rapide. Adapté de (Friedl and Bröcker, 2002) (B) Cellule T se déplaçant sur une bicouche lipidique recouverte d'ICAM-1 et de pCMH. Le rouge marque les interactions TCR-CMH et le vert LFA-1-ICAM1. Barre d'échelle=5 µm. Extrait de (Thauland and Parker, 2010) (C) *In vivo*, dans des ganglions de souris, des LT CD4⁺ exprimant LAT-EGFP, font de multiples contacts sans montrer une relocalisation de LAT au niveau d'une zone en particulier. Les cellules présentatrices ne sont pas mises en évidence dans cette expérience mais les nombreuses protrusions sont probablement dues à des contacts avec les CPA de l'hôte. La dernière vignette représente une projection des profils de cellules obtenus à différents temps. Extrait de (Azar et al., 2010).

Les kinapses contribuent à l'activation

Basée sur des observations faites *in vitro*, il a longtemps été admis que pour être activée, une cellule T naïve devait établir un contact stable, durable et continu avec une CPA (Dustin et al., 1997). Ces études ont pour la plupart été faites avec des lymphocytes B comme CPA ou sur des bicouches lipidiques. Plusieurs études ont démontré que ce n'était pas le cas et que la cellule pouvait accumuler des signaux à partir de contacts multiples et transitoires avec des CD matures.

L'intégration des signaux à travers la zone de contact ne doit pas nécessairement passer par une organisation élaborée des protéines de signalisation au niveau de la zone de contact. Les kinapses en sont un exemple frappant.

Des conséquences de l'activation peuvent en effet être observées lorsque les cellules T font des contacts dynamiques *in vivo*. Deux phases de plusieurs heures de contacts dynamiques ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (Mempel et al., 2004)(Miller et al., 2002). La première phase s'observe en même temps que l'expression des marqueurs d'activation CD44 et CD69 et est dépendante de la présence de CD mature et la seconde phase est simultanée avec la prolifération (Mempel et al., 2004). *In vitro*, dans des matrices en trois dimensions, de courtes interactions avec des CD matures peuvent induire une activation et la prolifération des lymphocytes T (Gunzer et al., 2000).

Lors de la formation de kinapses, la cellule T collecte des signaux et met en place son programme d'activation. Certains mécanismes seront décrits dans le chapitre ci-dessous.

Mécanismes de la sommation des signaux

In vitro et *in vivo*, malgré leur caractère transitoire, les kinapses qui se forment au contact des CD matures sont capables d'induire des signaux calciques dans les LT (Gunzer et al., 2000)(Azar et al., 2010).

In vitro, il a été montré en 2003 que les cellules T CD4⁺, peuvent être activées et produire de l'IFN γ même si les synapses immunologiques ont été interrompues avec un inhibiteur des src kinases. Dans ces cellules, l'interruption de la SI est associée à une abolition du signal calcique et de la phosphorylation des protéines ERK. Après le lavage de l'inhibiteur, les cellules peuvent de nouveau former des synapses et produire de l'IFN γ . La production d'IFN γ est d'ailleurs proportionnelle au temps de signalisation dans les cellules T et totalement indépendante du nombre d'interruption du signal (Faroudi et al., 2003b).

En 2011, l'équipe de Philippe Bousso a montré pour la première fois *in vivo* que les cellules T ont une « mémoire biochimique » suite à des reconnaissances transitoires et successives de leurs antigènes sur des CD. C-fos est un partenaire d'AP-1, un facteur de transcription qui permet l'activation des cellules T (comme décrit au chapitre II.1.D). Après une stimulation, le niveau de c-fos phosphorylé (en position Thr325) augmente puis se stabilise. Les cellules T stimulées *in vivo* avec un antigène spécifique pendant 30 min puis 30 min de nouveau *in vivo* après une pause, montrent un niveau d'expression de c-fos supérieur à celui obtenu dans des cellules T stimulées une seule fois. Les signaux s'additionnent et le niveau de phosphorylation de c-fos joue alors le rôle de compteur du nombre de stimulations que la cellule a subi. A plus long terme : les cellules doublement stimulées prolifèrent mieux que les cellules qui n'ont été stimulées qu'une seule fois (Clark et al., 2011). Ainsi les signaux d'activation initiaux peuvent être mémorisés par la cellule permettant une activation plus rapide de celle-ci lors des contacts futurs.

En conclusion, une interruption des contacts, comme ceux qui surviennent lors des phases de contacts transitoires dans les organes lymphoïdes secondaires, n'empêche pas l'activation de la cellule T. Celle-ci peut collecter des signaux et s'activer aussi bien qu'une cellule qui a fait un seul contact stable.

Analyse des kinapses in vivo

Au vu de l'avancée des connaissances sur le comportement des lymphocytes T *in vivo*, il serait réducteur de considérer les synapses monocentriques et multifocales comme des synapses stables et les kinapses comme des synapses en mouvement.

Dans des matrices de collagène en 3D les cellules T s'activent et prolifèrent sans s'arrêter totalement (Gunzer et al., 2000). *In vivo*, dans des ganglions, les cellules T peuvent exprimer à leur surface des marqueurs précoces de l'activation après avoir traversé une phase où les cellules décélèrent sans jamais s'arrêter longtemps (Mempel et al., 2004).

Dans ces deux modèles la morphologie des synapses n'est pas accessible. Il n'est cependant pas à exclure que des synapses monocentriques ou multifocales pourraient survenir dans ces conditions. Des études ont en effet montré que les synapses monocentriques, en dépit de leur longue cinétique d'apparition, peuvent contre toute attente, avoir un aspect dynamique.

En 2007, une étude *in vitro* faite avec des bicouches lipidiques a mis en évidence, pour la première fois, le caractère dynamique des synapses monocentriques. Dans cette étude les auteurs ont montré que la cellule pouvait engager ses TCR avec des pCMH sur le support et se déplacer selon des phases de migrations lentes et rapides. La rupture de stabilité serait médiée par la PKC θ . Quand cette kinase, se relocalise en périphérie de la synapse monocentrique au niveau du pSMAC, elle provoque une rupture de symétrie de cet anneau d'intégrine et c'est vers cette brèche que le lymphocyte T migre pour aller former d'autres synapses plus loin. Ses effets sont contrebalancés par WASp, une protéine régulatrice du cytosquelette d'actine qui permet à la cellule d'établir une synapse de nouveau (Sims et al., 2007). Un des modes d'action de la PKC θ pourrait être de réguler négativement la myosineIIA, un moteur moléculaire de l'actine qui se localise aussi à la synapse. Sa phosphorylation transitoire, entre 5 et 10 min, après l'activation du TCR, permettrait d'abaisser la tension corticale au niveau de la synapse, autorisant la cellule à se déplacer pour aller former une synapse plus loin (Jacobelli et al., 2004). Des cellules déficientes en PKC θ peuvent, *in vivo* et *in vitro*, faire des contacts plus stables que la moyenne (Sims et al., 2007).

En 2012, l'équipe de M. Krummel a renforcé les connaissances sur la dynamique de la synapse monocentrique en étudiant le mouvement des microclusters. Elle a montré que sur une bicouche lipidique, lors de la formation d'une synapse monocentrique, la cellule pouvait continuer à se déplacer et faire glisser sa synapse contre le support. Lors de ce mouvement, le vecteur correspondant à la moyenne des directions individuelles des microclusters est parallèle au vecteur de direction de la cellule. De façon inattendue, les cellules en mouvement intègrent les signaux du TCR à travers ces microclusters puisqu'elles font une réponse calcique (Beemiller et al., 2012).

Les résolutions des techniques de microscopie *in vivo* sont à ce jour trop limitantes pour pouvoir envisager d'observer l'architecture des synapses lors des phases de contacts transitoires. Les bicouches lipidiques, bien que peu physiologiques et inductrices principalement de synapses monocentriques, ont l'avantage de nous éclairer sur les caractéristiques des mouvements individuels des microclusters en attendant le développement de nouvelles techniques.

Les études récentes démontrent finalement, que les cellules peuvent capter des signaux « au vol » à travers des synapses mobiles. L'importance des signaux « stop » et des synapses stables dans l'activation mériteraient d'être revisités à leur lumière (Gérard et al., 2013).

D. CONCLUSIONS

Quelle que soit la synapse observée, les interactions entre un LT et une CPA ou une cellule cible sont primordiales pour le destin de la cellule T. La Figure 18 illustre le devenir des lymphocytes T après leur interaction avec différentes cellules.

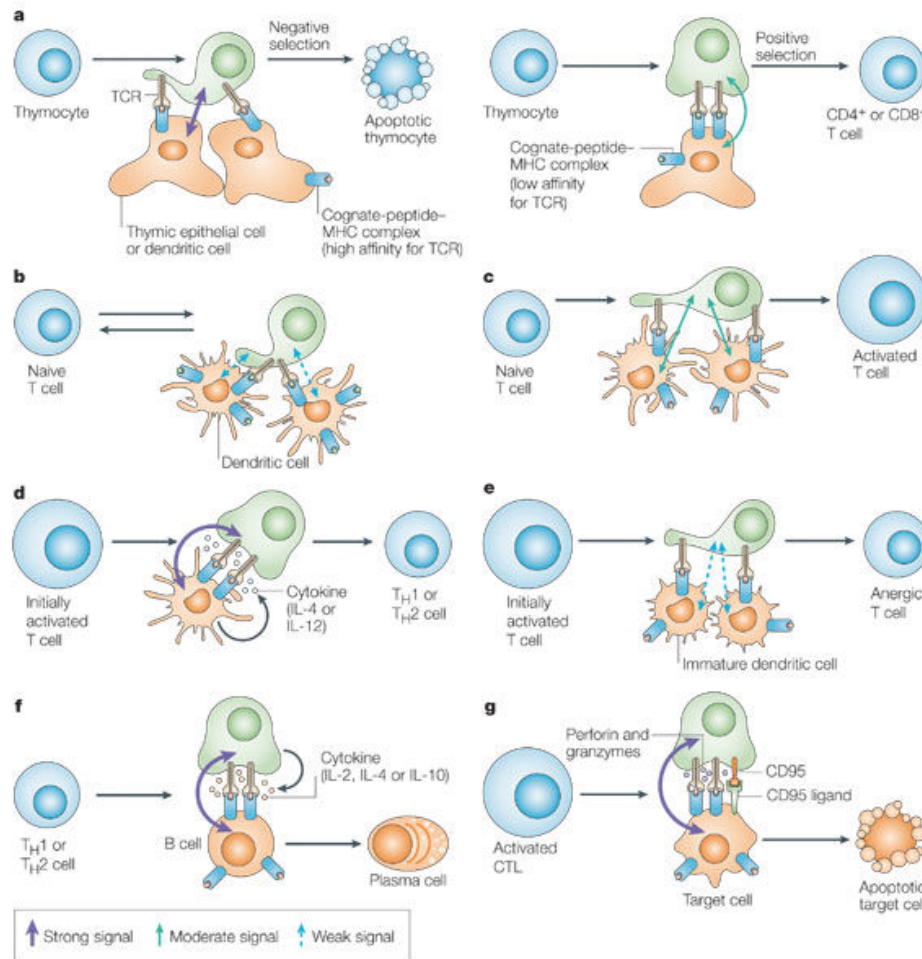


Figure 18: Synapses et destins cellulaires.

Dans le thymus, les synapses stables et dynamiques, lors de la sélection négative et positive, peuvent mener à la mort ou à la survie de la cellule, et à la différenciation en cellule CD4⁺ ou CD8⁺ (a). Dans les organes lymphoïdes secondaires, les synapses dynamiques et multiples avec des CD confèrent survie aux LT naïfs (b) mais aussi activation si la cellule a cumulé suffisamment de signaux en présence d'un peptide agoniste (c). Pour les cellules T CD4⁺ préalablement activées, une synapse stable avec une CPA et une stimulation forte, permettent à la cellule de bénéficier des cytokines sécrétées pour se différencier en cellule effectrice T_H1 ou T_H2 (d). Des séries d'engagements faibles peuvent au contraire rendre la cellule anergique (e). La cellule T_H peut favoriser la différenciation des LB activées en plasmocytes grâce à la formation d'une synapse sécrétrice. Les cytokines sécrétées dans cette synapse vont permettre d'activer le switch isotypique et la maturation d'affinité dans la cellule B (f). En périphérie, les lymphocytes T cytotoxiques, peuvent entraîner la mort de leur cible grâce à la formation d'une synapse sécrétrice dans laquelle sont relarguées des granules lytiques (g). Le vert symbolise les cellules dans lesquelles une transduction du signal a lieu. L'épaisseur des flèches est proportionnelle à la force du signal. Figure extraite de (Friedl et al., 2005).

IV. LA POLARISATION DES CYTOSQUELETES ET LE TRAFIC INTRACELLULAIRE LORS DE LA FORMATION DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE

Pour présenter une organisation aussi élaborées les synapses mobilisent les cytosquelettes de la cellule et détournent à leur attention les activités du trafic vésiculaire.

Les cytosquelettes de filaments d'actine et de microtubules assurent l'architecture des contacts et la dynamique des complexes de signalisation, critiques pour la régulation du TCR. Les compartiments vésiculaires, assurent le transport des récepteurs, des protéines de signalisation mais aussi les molécules destinées à être exocytées, à la SI

Je parlerai ci-dessous du mécanisme par lesquels le signal TCR peut réorganiser le cytosquelette et le trafic vésiculaire et comment ces derniers peuvent influencer, à leur tour, l'activation et les fonctions effectrices des cellules T.

1. RÉORGANISATION DU CYTOSQUELETTE D'ACTINE EN RÉPONSE À UN SIGNAL TCR

Dès l'interaction entre un LT et une CPA, le cytosquelette d'actine subit une réorganisation profonde. L'uropode, riche en filaments d'actine, impliqué quelques secondes auparavant dans le mouvement de la cellule, se rétracte. Le LT s'arrondit alors et projette des pseudopodes et des lamellipodes riches en filaments d'actine en direction de la CPA. Je décrirai ci-dessous les mécanismes qui conduisent à la polymérisation de l'actine dans les LT suite à l'engagement du TCR

La signalisation par le TCR, permet après l'activation des kinases Lck et ZAP-70, la mise en place d'un complexe qui s'assemble autour des protéines LAT et SLP76. La perte d'une de ces protéines entraîne une abolition de la polymérisation de l'actine au niveau de la SI. La GEF Vav1 est phosphorylée et recrutée, au niveau de ce complexe et constitue le point de départ de la mise en place de la polymérisation de l'actine (Bustelo, 2002).

A. POLYMÉRISATION DÉPENDANTE DU COMPLEXE ARP2/3

L'engagement du TCR active indirectement de nombreuses protéines régulatrices de l'actine qui agissent de concert pour entraîner la polymérisation au niveau de la SI. La GEF Vav1 qui active les Rho GTPases Rac1 et Cdc42 à la zone contact fait partie de ces acteurs (Burkhardt et al., 2008).

La polymérisation de l'actine est un processus instable naturellement. Des protéines peuvent se brancher sur les filaments existants pour les stabiliser et permettre la formation de nouveaux embranchements. Le complexe Arp2/3 en fait partie et s'associe avec WASP et WAVE2, des NPFs (*Nucleation-promoting factors*), qui vont l'activer et à partir desquels la polymérisation va démarrer. La protéine HS-1 est aussi activatrice mais a des effets plus modestes. Toutes trois se lient à Arp2/3 grâce à leur domaine NTA (*N terminal acidic region*) (Burkhardt et al., 2008).

Activation d'Arp2/3 par WASP

WASP, l'activateur d'Arp2/3 le mieux caractérisé, doit son nom au syndrome de Wiskott Aldrich, une immunodéficience sévère. La partie N terminal de WASP se lie à WIP (*WASP interacting protein*) empêchant ainsi sa propre dégradation (de la Fuente et al., 2007). Le recrutement et l'activation de WASP, au niveau de la zone de contact, surviennent grâce à son interaction avec les domaine SH3 des protéines adaptatrices Nck et PST-PIP (Badour et al., 2003)(Zeng et al., 2003). Comme Nck est lié au complexe LAT/SLP-76, WASP se retrouve ainsi proche de la zone de contact.

La Rho GTPase Cdc42, préalablement activée par la GEF vav1, également présente dans ce complexe, peut alors se lier au domaine GBD (*GTPase binding domain*) de WASP (Zeng et al., 2003). Sa liaison entraîne une ouverture de WASP ce qui a pour effet d'exposer des domaines d'interaction avec Arp2/3.

La cofiline qui joue le rôle de régulateur négatif, maintient la fermeture de WASP mais se retrouve libérée par un effet de compétition en présence de Cdc42 (Kim et al., 2000).

Des cellules humaines et murines déficientes en WASP montrent des défauts importants de signalisation menant à la production d'IL-2. Cette observation doit être due à l'impossibilité pour ces cellules de faire des synapses. En effet des cellules avec le gène WASP invalidé ne parviennent pas à s'arrêter de migrer sur des supports cellules (Sims et al., 2007).

Activation d'Arp2/3 par WAVE2

WAVE2, une autre NPF qui peut activer Arp2/3 est une protéine effectrice de la Rho GTPase Rac1. Une extinction de l'expression de WAVE2 dans des cellules Jurkat entraîne une perte importante de la polymérisation de l'actine à la SI. Ces cellules présentent également des difficultés à établir des contacts suggérant un rôle de WAVE2 sur l'activation des intégrines (Zipfel et al., 2006)(Nolz et al., 2006).

WAVE2 est intégré à un complexe qui se compose de 5 protéines qui se stabilisent les unes les autres en s'associant (Innocenti et al., 2004). Contrairement à WASP, il n'a pas de domaine GBD pour lier directement sa GTPase : Rac1 (Miki et al., 1998). La liaison, qui se fait grâce à l'adaptateur IRSp53 appartenant au complexe, entraîne une relocalisation de WAVE2 à la membrane où il peut se fixer à ARP2/3 pour l'activer (Miki et al., 2000).

Activation d'Arp2/3 par HS1

Il existe un troisième activateur direct d'Arp2/3 : HS1 (*Haematopoietic lineage cell-specific protein 1*) qui peut aussi se lier directement à l'actine filamenteuse. C'est un homologue de la cortactine qui possède les mêmes effets (Hao et al., 2005). Son rôle serait de stabiliser le réseau d'actine déjà formé en faisant un pont entre Arp2/3 et les filaments d'actine. Il augmenterait aussi le taux d'assemblage d'actine autour d'Arp2/3 (Urano et al., 2003) (Weaver et al., 2001).

WASP, WAVE2 et HS1 peuvent interagir avec des protéines déjà recrutées au niveau de la synapse (Cdc42, Rac1). Ces liaisons qui précèdent leur activation permettent la formation d'un complexe avec Arp2/3 promouvant la polymérisation de l'actine (Burkhardt et al., 2008).

La Figure 19 illustre les cascades d'événements qui surviennent en amont de l'activation d'Arp2/3.

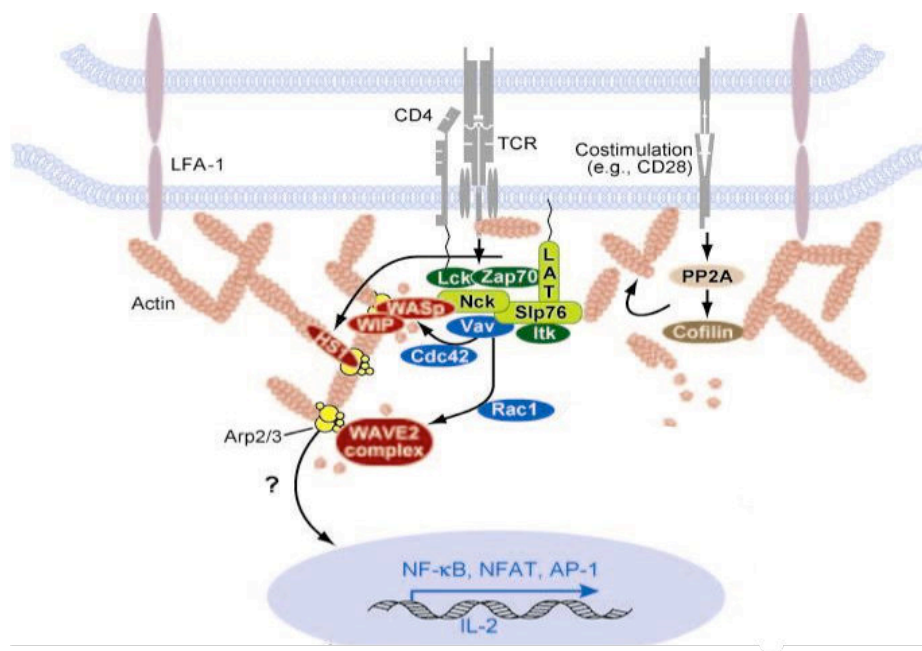


Figure 19: Les acteurs de la polymérisation de l'actine

En réponse à l'engagement du TCR, Arp2/3 peut être activé grâce aux NPF, WASP et WAVE2 ainsi que HS1. Leur activation dépend de la formation du complexe LAT/SLP76. Adapté de (Burkhardt et al., 2008).

Il existe aussi des mécanismes de polymérisations de l'actine indépendants d'Arp2/3.

B. POLYMÉRISATION INDÉPENDANTE DU COMPLEXE ARP2/3

La cofiline, une petite protéine de 19 kDa qui peut à la fois rompre des filaments d'actine, promouvoir la dépolymérisation et stabiliser des extrémités pour la génération de nouveaux embranchements joue un rôle important dans le contrôle des réponses dépendantes de l'actine au niveau de la synapse (Eibert et al., 2004). La cofiline est phosphorylée dans les cellules T au repos et peut être déphosphorylée par les phosphatases PP1 et PP2 lorsque les molécules de co-stimulation sont engagées (Ambach et al., 2000)(Samstag et al., 1992).

Les formines sont des NPF qui promeuvent la formation de longs filaments d'actine. Deux types de formines ont été retrouvés dans les LT : FMNL1 (Formin-like-1) et Dia1 (diaphanous-1). Elles ne sont pas essentielles pour la polymérisation de l'actine mais ont montré un rôle pour la relocalisation du MTOC et l'activité cytotoxique (Gomez et al., 2007).

La protéine EVL se fixe aux extrémités des filaments et favorise la croissance des filaments en empêchant la liaison des protéines stabilisatrices (Krause et al., 2003).

Les activités de la formine et de EVL sont difficiles à isoler dans une cellule T où Arp2/3 est activé. Les larges lamellipodes générés grâce à la polymérisation de l'actine, induite par Arp2/3, peuvent masquer les effets des inhibiteurs de ces protéines (Burkhardt et al., 2008).

D'autres protéines montrent des effets non négligeables sur la polymérisation de l'actine mais leurs mécanismes n'ont pas encore été élucidés. C'est le cas de l'Ezh2. Dans des cellules T matures déficientes pour cette protéine, l'actine présente des défauts de polymérisation. Cette protéine possède une activité méthyl-transférase mais l'identification de ses substrats et l'implication de cette activité n'ont pas été encore montrées. Son effet semble se situer en amont de Cdc42 dans la cascade car des cellules déficientes en Ezh2 ne peuvent plus activer Cdc42 (Su et al., 2005).

C. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE ET LA SIGNALISATION DANS LES LT

Les filaments d'actines ne sont pas impliqués dans la formation des microclusters mais influent fortement sur leur dynamique (Monks et al., 1998)(Roumier et al., 2001)(Yokosuka et al., 2005)(Varma et al., 2006).

Ces mécanismes sont probablement médiés par des protéines qui font le lien entre des protéines ancrées dans la membrane plasmique et le cytosquelette. L'eitrine de la famille des ERM (*Ezrin*, *Radixin*, *Moesin*), présente au niveau de la synapse, peut se lier à la fois à de nombreuses protéines transmembranaires (ZAP-70, SLP-76, PI3K, PKC) via son domaine FERM en N-Terminale et à l'actine corticale via son domaine C-terminale. Les protéines de cette famille possèdent une conformation repliée où les extrémités N et C-terminales se touchent et une autre ouverte où les deux extrémités peuvent se lier à leur ligand. Leur ouverture a lieu suite à la phosphorylation d'une thréonine qui peut être réalisée en amont de la signalisation TCR par la PKC θ (Roumier et al., 2001).

Le cytosquelette d'actine joue un rôle majeur dans l'expression de l'IL-2 qui se produit après qu'une cellule ait été activée. Comme montré dans les études suivantes, l'altération de son intégrité et des effets de ses protéines associées perturbent en fait l'activation des trois facteurs de transcription : NFAT, NF- κ B et AP-1 qui régulent l'expression de cette cytokine.

La surexpression d'un dominant négatif de l'eitrine ne provoque pas d'altération de la signalisation précoce malgré une absence de maturation des synapses. Un défaut d'activation de NFAT est en revanche observé (Roumier et al., 2001). Une approche, plus récente, par SiRNA a confirmé ces résultats (Lasserre et al., 2010).

Un traitement des cellules avec la cytochalasine D, qui inhibe la polymérisation, affecte le flux calcique et de façon non surprenante l'activation de NFAT. Ces observations sont plus ou moins importantes selon les doses et les temps de traitement. Ce double effet a également été rapporté dans des cellules déficientes en Vav1, WASP, WAVE2 et HS-1 (Valitutti et al., 1995b)(Nolz et al., 2006)(Cannon and Burkhardt, 2004)(Gomez et al., 2006).

D'autres études ont mis en évidence que des cellules déficientes en WASP et Vav1 montraient des défauts d'activation d'AP-1 tandis que des cellules déficiente en Vav1 et HS1 montraient des défauts d'activation de NF- κ B (Costello et al., 1999)(Cianferoni et al., 2005)(Gomez et al., 2006).

Les mécanismes qui permettent d'expliquer comment l'actine agit sur ces facteurs de transcription ne sont pas encore bien clairs mais la clé résiderait peut être dans la formation de complexes stables, dans cet enchevêtrement de filaments, qui favoriseraient le maintien de la signalisation (Gomez et al., 2006).

D. LE CYTOSQUELETTE D'ACTINE JOUE UN RÔLE DANS LA DÉGRANULATION

Le cytosquelette d'actine a longtemps été exclu des mécanismes de sécrétions à la SI. En effet de nombreuses études montrent que les filaments d'actines sont présents uniquement dans le pSMAC et totalement exclus du cSMAC. Cette absence d'actine, au centre, au niveau de la zone sécrétrice suggérerait que les granules cytotoxiques pouvaient accéder plus facilement à la membrane sans être freinées par cet enchevêtrement dense de filament (Stinchcombe et al., 2006)(Vyas et al., 2001). Ce modèle a dû être revu étant donné que la myosine II, un moteur moléculaire de l'actine est requis pour la dégranulation dans des Natural killers (Andzelm et al., 2007)(Sanborn et al., 2009). Par des méthodes de microscopie haute résolution, il a été montré dans ces cellules, que le réseau d'actine peut être remodelé et que des granules peuvent être sécrétées à travers un réseau d'actine lâche finement contrôlé (Rak et al., 2011)(Brown et al., 2011).

Dans les LT CD4⁺, le cytosquelette d'actine est également moins dense au niveau du cSMAC. Ce remodelage est régulé par Cdc42 dont le rôle dans le contrôle de la polymérisation de l'actine a été décrit au chapitre IV.1.A. En absence de Cdc42, les filaments d'actine s'accumulent au niveau du cSMAC et la sécrétion des cytokines est altérée (Chemin et al., 2012).

La polymérisation de l'actine, régulée grâce au signal TCR, agit en retour sur la signalisation du TCR et sur les fonctions effectrices de la cellule T comme la sécrétion polarisée des cytokines et des granules. Le cytosquelette d'actine exerce ses effets en collaboration avec un autre cytosquelette : le cytosquelette de microtubules.

2. POLARISATION DU CYTOSQUELETTE DE MICROTUBULES ET DU CENTROSOME

Lors de la reconnaissance d'une CPA, les microtubules et le centre organisateur des microtubules : le MTOC ou centrosome se réorientent sous la zone de contact. Le MTOC peut s'amarrer à seulement 500 nm de la membrane et les microtubules (assemblés à partir de protofilaments de tubulines) à 50 nm (Hashimoto-Tane et al., 2011)(Stinchcombe et al., 2011).

Ces événements sont aujourd'hui considérés comme une signature de la reconnaissance d'un antigène agoniste à la surface de la CPA. Ils ont été observés dans des LT CD4⁺ et CD8⁺ naïfs et activés dès 1982 (Geiger et al., 1982)(Kupfer and Dennert, 1984)(Kupfer et al., 1986)(Kuhn and Poenie, 2002).

Le MTOC sert de point focal pour le trafic vésiculaire, qui influe sur la formation de la SI grâce au recyclage des vésicules. Il est en étroite interaction avec l'appareil de Golgi et les compartiments

endosomaux. Dans les CTL et les T_H , il guide l'export des vésicules de perforine, granzymes et de cytokines vers le centre de la synapse (Stinchcombe et al., 2001).

M. Huse, ayant réalisé de nombreuses études sur ce sujet, a publié une revue récemment qui permet de faire le lien entre toutes les données qui ont été publiées sur la régulation de ce phénomène (Huse et al., 2013).

A. RÉGULATION

Le repositionnement du MTOC est indépendant des signaux d'adhésion (Lowin-Kropf et al., 1998)(Sedwick et al., 1999). Il est en revanche dépendant du TCR et plus précisément des motifs ITAM des chaînes du CD3. De façon non surprenante, les molécules en aval du TCR sont-elles aussi impliquées. Les Src kinases Lck et Fyn, la kinase ZAP-70 mais aussi les protéines du complexe LAT avec SLP76, VAV1 et Cdc42 font partie de ces acteurs (Martín-Cófreces et al., 2006)(Kuhné et al., 2003)(Stowers et al., 1995).

La PLC γ est une enzyme importante dans cette cascade. Elle hydrolyse le PIP₂ pour produire de l'IP3 et du DAG. Son inhibition entraîne une abolition totale de la relocalisation du MTOC (Quann et al., 2009). Le mécanisme doit donc être régi par les effets d'un ou deux de ces messagers secondaires.

L'IP3, comme décrit dans la partie II.1.B déclenche la libération des stocks calciques. Le signal calcique a été montré au préalable comme important pour la relocalisation du MTOC (Kuhné et al., 2003)(Kupfer and Dennert, 1984). Ces études ont cependant été menées sur des cellules, traitées avec des chélateurs du calcium libre, qui devaient établir des contacts sur un support ou une CPA. Or le calcium induit un changement de morphologie de la cellule et est requis pour une formation de conjugués optimale (Donnadieu et al., 1994)(Huse et al., 2013). Les effets observés sont donc biaisés dans ces modèles où les cellules ne doivent pas faire suffisamment de contacts productifs pour déclencher une réponse TCR. Dans le modèle utilisé par l'équipe de M. Huse, les cellules sont forcées d'adhérer au support (grâce à des anticorps) et déclenchent une réponse TCR. Même en présence d'un chélateur du calcium, le MTOC est toujours capable de se relocaliser dans ce modèle (Quann et al., 2009).

L'effet de la PLC sur la relocalisation du MTOC ne s'exerce donc pas via l'IP3 et le signal calcique qu'il entraîne mais par le DAG.

Le DAG guide le mouvement du MTOC

Cette même équipe a montré qu'en ciblant spécifiquement le lieu où le TCR est engagé, grâce à des pCMH activé par un flash UV, il est possible, 10 à 15 secondes plus tard, de voir une accumulation de DAG au niveau des TCR stimulés. Cette observation précède celle de la relocalisation du MTOC indiquant que les deux événements pourraient avoir une relation causale. Pour aller plus loin dans cette hypothèse, les auteurs ont utilisé du DAG encagé qui peut être libéré par un flash UV. Dans ces conditions, le MTOC initialement à l'opposé de la zone de flash, se relocalise précisément là où le DAG a été libéré. Ce mécanisme de guidage par le DAG suggère que ce dernier soit soumis à un contrôle de son gradient. Ce gradient est probablement contrôlé par les DGK (DAK kinases) puisqu'une inhibition de leur

activité empêche l'accumulation du DAG à un point précis en réponse à un signal TCR, mais également la polarisation du MTOC (Quann et al., 2009).

Plusieurs isotypes des PKC induisent et maintiennent la polarisation du MTOC

La famille des nPKC (nouvelles isoformes de PKC) comprend la PKC θ , la PKC ϵ , la PKC η . Leur l'activité dépend du DAG. Les PKC η et PKC ϵ arrivent à la synapse 15 à 20 secondes avant l'arrivée du MTOC tandis que la PKC θ arrive 5 secondes avant seulement. Le recrutement de l'ensemble de ces trois kinases est surprenant étant donné que seule la PKC θ induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B et est importante pour la réorientation du MTOC (Quann et al., 2011). Le décalage de cinétique peut également surprendre puisque ces trois kinases sont recrutées au niveau de la SI par un même mécanisme : leur liaison au DAG par leur domaine C1. Cette différence de cinétique pourrait s'expliquer par leurs constantes d'affinité avec le DAG qui diffèrent entre elles (Melowic et al., 2007)(Stahelin et al., 2005). Leur recrutement est aussi régi par leur extrémité N-terminale qui se lie aux phospho-tyrosines de protéines situées au niveau de la synapse comme CDCP1 et Lck (Stahelin et al., 2012)(Kong et al., 2011).

L'isoforme PKC ζ de la famille des aPKC (PKC atypique), joue aussi un rôle dans la relocalisation du MTOC (Bertrand et al., 2010). Elle est recrutée à la SI grâce à Par3 avec qui elle forme un complexe (Figure 20C). Une inhibition de la formation de ce complexe empêche la relocalisation du MTOC (Lin et al., 2009). Bien que la PKC ζ ne soit pas régulée par le DAG, Par3 qui s'avère la réguler interagit avec l'acide phosphatidique qui est générée à partir de DAG.

En conclusion, il est probable que les quatre PKC décrites ci-dessus, agissent à la synapse en aval du DAG pour réorienter le MTOC.

M. Huse a proposé un modèle hypothétique en deux étapes où la signalisation initiée par la PKC ϵ , PKC η et PKC θ permettrait de guider le MTOC jusqu'à la synapse là où elles sont localisées grâce au DAG. La PKC ζ , recrutée ensuite par Par3, le stabiliserait sous la membrane (Huse et al., 2013).

Des études sur les événements moléculaires qui surviennent entre l'activation des PKC et le mouvement du MTOC sont actuellement en cours et sont centrées sur l'étude des deux moteurs moléculaires : la dynéine et la myosine II.

La myosine II et la dynéine sont recrutées à des pôles opposés

La dynéine fait partie des moteurs moléculaires des microtubules. Elle se déplace le long de ces filaments du pôle 'plus' vers le pôle 'moins', on parle de mouvement rétrograde. Elle a de nombreux partenaires dont la dynactine, un cofacteur qui peut se lier à des cargos (Huse et al., 2013). Son recrutement au niveau de la synapse survient 5 secondes avant l'arrivée du MTOC et après le recrutement des nPKC (Quann et al., 2009).

La myosine II est un moteur de l'actine qui joue un rôle important dans la migration des cellules T (Jacobelli et al., 2004). C'est un complexe hetero-hexamérique qui est composé de deux chaînes lourdes,

deux chaînes légères essentielles et deux chaînes légères régulatrices et qui est retrouvé à l'arrière de la synapse (Liu et al., 2013).

Dans des cellules T primaires, une extinction de la dynéine par une approche de siRNA n'entraîne pas de défaut majeur de la polarisation du MTOC (Liu et al., 2013)(Hashimoto-Tane et al., 2011). Il en est de même pour l'extinction de la myosine II. Une extinction des deux protéines en même temps mène en revanche à un blocage total de la polarisation du MTOC. Il existe alors un mécanisme de compensation entre ces deux molécules (Liu et al., 2013).

L'équipe de M. Huse a montré dans des expériences utilisant des pCMH photo-activables que la dynéine s'accumulait à la zone de stimulation alors que la myosine II se localisait au pôle opposé et faisait des clusters sous-corticaux. Ces observations sont dépendantes de l'ensemble des nPKC puisqu'une perte de ces dernières entraîne une absence de relocalisation des moteurs (Liu et al., 2013). La myosine II possède deux sérines phosphorylables par les nPKC dans son domaine régulateur. La phosphorylation de ces deux sites provoque une réduction de leur activité motrice et une altération de leur localisation subcellulaire (Ikebe and Reardon, 1990)(Komatsu and Ikebe, 2007). Ce mécanisme serait probablement responsable de leur absence à la SI et leur relocalisation à l'arrière. En effet une mutation de ces deux sites permet d'observer la présence de clusters de myosine au niveau de la synapse (Liu et al., 2013).

Certaines études montrent cependant que des pools de myosines II sont présents au niveau de la synapse au niveau des zones riches en filament d'actine. Ils joueraient un rôle dans le mouvement des microclusters et la signalisation précoce des TCR (Yi et al., 2012)(Ilani et al., 2009).

Le mécanisme dépendant des nPKC pour la relocalisation de la dynéine n'a pas encore été mis au jour. Son recrutement est cependant dépendant d'une protéine échafaudage: ADAP (Combs et al., 2006).

Une fois localisées à des pôles opposés, la myosine II et la dynéine peuvent collaborer pour générer des forces qui mettent le MTOC en mouvement.

Les mécanismes de la collaboration entre la dynéine et la myosine II

A l'arrière, les forces exercées par la myosine II, à travers les filaments d'actines, pourraient être propagées via les extrémités des microtubules ancrés dans les clusters de myosine. A l'avant, la dynéine, pourrait de son côté hisser le MTOC. Ces forces se contrebalanceraient pour amener le MTOC à la SI (Huse et al., 2013) (Figure 20A).

Une collaboration entre deux moteurs moléculaires : la dynéine et la myosine II, a déjà été montrée comme favorisant la polarisation du MTOC dans des cellules adhérentes (Gomes et al., 2005). Le mouvement des microtubules dépendant de la myosine a lui aussi déjà été étudié. Il a fait l'objet de modélisation et d'observation dans des cellules épithéliales (Zhu et al., 2010)(Burakov et al., 2003).

Le fait que des protéines impliquées dans la régulation de ces deux cytosquelettes ou qui font le lien entre eux soient importantes pour la relocalisation du MTOC, renforce cette hypothèse. C'est le cas de la caséine kinase 1, la stathmine, la formine II et de HDAC6.

La caséine kinase 1 et la stathmine sont des protéines régulatrices des microtubules. La première est impliquée dans la stabilisation des extrémités 'plus' et la seconde dans la croissance des microtubules (Filbert et al., 2012)(Zyss et al., 2011). La formine 2 est impliquée dans la génération des filaments d'actine indépendamment du complexe Arp2/3 comme décrite au chapitre IV.1.B (Gomez et al., 2007). La tubuline déacétylase HDAC6 a une activité sur la tubuline alpha qui se concentre principalement au niveau de la synapse (Serrador et al., 2004).

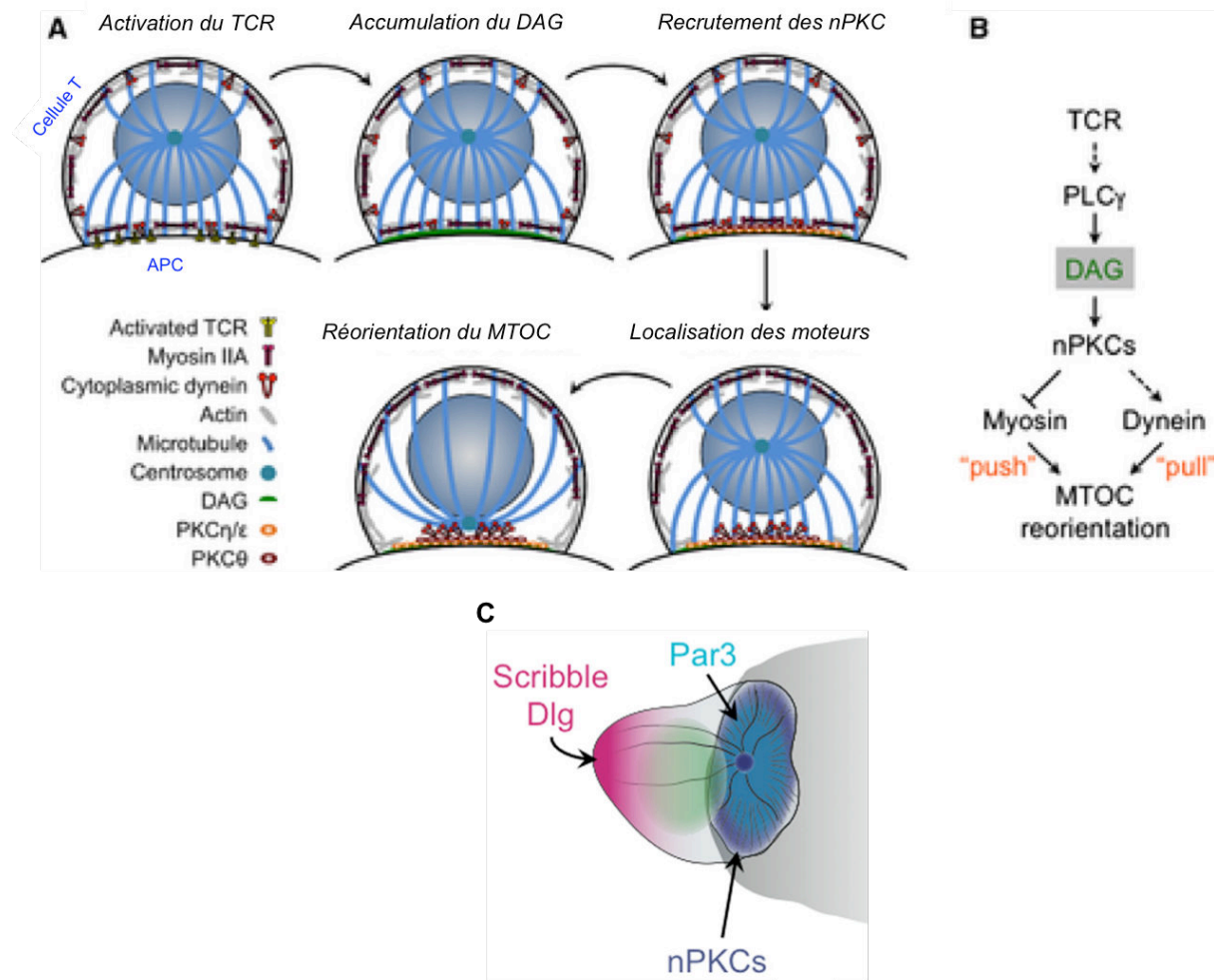


Figure 20: Mécanismes moléculaires de la relocalisation du MTOC

(A) Après l'accumulation du DAG suite à l'activation du TCR, les nPKC seraient recrutées à la SI. Ce recrutement entraînerait la polarisation de la dynéine et l'exclusion de la myosine II à la SI. L'ancrage des microtubules à la SI par des protéines stabilisatrices permettrait au MTOC d'être hissé vers la SI grâce à la dynéine. Le mouvement de l'actine permis par la myosine II au pôle opposé pousserait le MTOC à l'avant. (B) Représentation de la cascade menant au recrutement de deux moteurs moléculaires, la dynéine et la myosine II à des pôles opposés. (C) Mécanismes de recrutement des nPKC à la SI par le couple Par3/Scribble, Dlg. Les complexes Par et Scribble/Dlg s'assemblent dans des compartiments opposés dans les cellules T qui forment des conjugués. Par3 est retrouvé au niveau de la synapse, là où le DAG est produit, alors que le complexe Scribble/Dlg est retrouvé à l'arrière (Ludford-Menting et al., 2005). Ces deux complexes ont des effets antagonistes et peuvent se faire face pendant des heures à des jours dans des cellules polarisées comme les neurones, les fibroblastes ou les cellules épithéliales.

(A) (B) extrait de (Liu et al., 2013) et (C) extrait de (Huse, 2012).

B. QUELS SONT LES EFFETS DE LA POLARISATION DES MICROTUBULES ET DU MTOC ?

Effet sur l'activation et la synapse immunologique

Une étude de F. Sanchez-Madrid, dans des cellules Jurkat, a montré que la translocation du MTOC modulait la formation de la SI et contrôlait le maintien de la signalisation. Dans des cellules où l'activité de la dynéine a été perturbée, les cellules T voient la relocalisation de leur MTOC altérée (mais pas abolie). Dans ce cas là, la synapse mature est désorganisée avec la présence de CD3 dans le pSMAC, l'état de phosphorylation de ZAP70, LAT et vav1 est réduit et LAT a un défaut d'export à la surface au niveau de la SI. Leur production d'IL2 est également altérée. De façon intéressante, l'expression d'un marqueur précoce de l'activation, CD69, ne varie pas. Ces données suggèrent que la présence du MTOC à la SI pourrait favoriser la stabilisation du signal menant à l'activation totale (Martín-Cófreces et al., 2008).

Comment les microtubules émanant du MTOC sont-ils capables d'influencer l'architecture de la SI à l'échelle des microclusters. Un des mécanismes serait peut-être lié aux microtubules acétylés qui sont connus pour stabiliser certaines structures. Dans les cellules T, la présence des microtubules acétylés par la protéine HDAC6 est nécessaire pour une organisation optimale des microclusters de CD3 à la synapse. Ces microtubules modifiés se concentrent autour des clusters de CD3 et LFA-1 et subissent des phases d'acétylation-déacétylation qui sont requises pour la formation, la maturation et la maintenance de la SI. Ils interviennent aussi sur l'activation puisque dans des cellules qui subissent une surexpression de HDAC6, la synthèse d'IL-2 est altérée (Serrador et al., 2004).

Concernant la dynamique au sein de la synapse, l'équipe de T. Saito a montré dans des cellules T murines sur des bicouches lipidiques que la dynéine et la dynactine colocalisaient avec les microclusters de TCR et que leur mouvement était simultané. Les TCR sont en fait capables de se déplacer, à la synapse, grâce au moteur de la dynéine vers le pôle 'moins'. Le mouvement suit la direction des microtubules qui forment des rails sous la membrane (voir Figure 21). Une inhibition de l'activité de la dynéine provoque une réduction importante de la vitesse des microclusters et empêche la formation du cSMAC. Dans ces cellules, il y a une augmentation de la phosphorylation de LAT et de l'expression d'IL-2. Ces données suggèrent que ce mouvement, dépendant du couple dynéine-dynactine, améliore l'internalisation et la terminaison du signal au niveau du cSMAC (Hashimoto-Tane et al., 2011).

Il est intéressant de noter que dans l'étude de T. Saito, l'extinction de la dynéine par une approche de siRNA entraîne une augmentation de l'expression de l'IL2 alors que dans l'étude menée par l'équipe de F. Sanchez-Madrid l'inhibition de son activité entraîne une diminution. La divergence de ces observations doit résider dans le fait que ces deux études n'utilisent pas les mêmes modèles cellulaires : des conjugués Raji/Jurkat pour l'une et des cellules T murines/bicouches lipidiques pour l'autre. D'autre part l'inhibition de la dynéine dans l'étude de T. Saito ne permet pas d'inhiber la relocalisation du MTOC alors qu'elle l'inhibe partiellement dans l'étude de F. Sanchez-Madrid. Le rôle de la dynéine, dans le maintien et l'extinction du signal, doit être approfondi pour mieux comprendre ces différences.

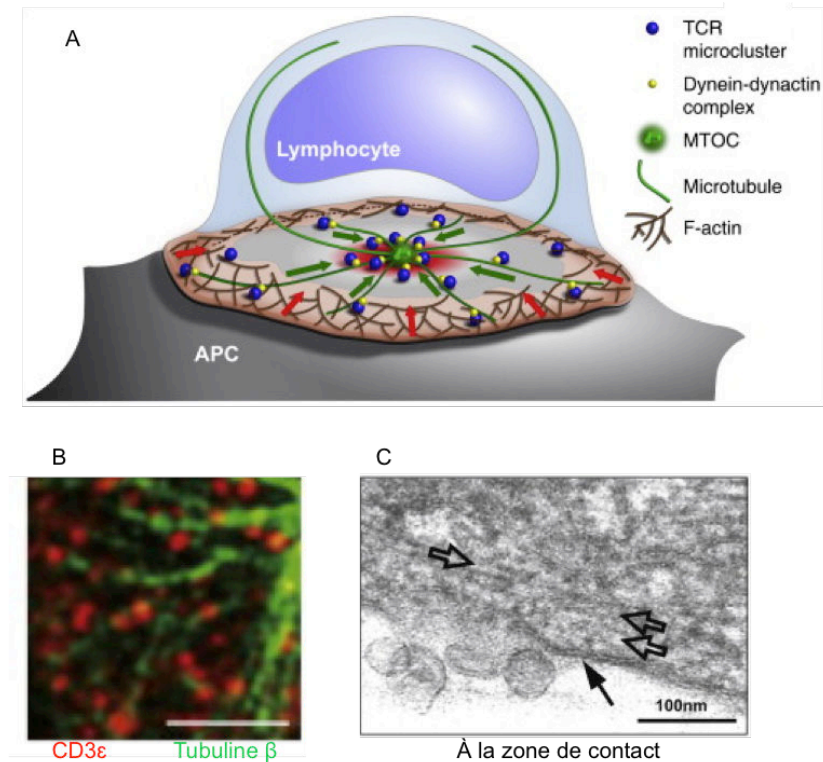


Figure 21: Rôle des microtubules au niveau de la synapse

(A) représentation schématique du mouvement des microclusters en bleus vers le cSMAC au niveau de la SI grâce au complexe dynéine/dynactine en jaune. L'ancrage du MTOC au centre de la synapse est nécessaire pour guider le mouvement. Extrait de (Babich and Burkhardt, 2011). (B) Image de microscopie par TIRF obtenue à la zone de contact entre une cellule T murine et une bicouche lipidique. Les microclusters de TCR symbolisés par des spots semblent décorer les microtubules. Barre d'échelle : 1 μ m. (C) Par microscopie électronique, les auteurs ont pu mesurer que la distance, entre les filaments (flèches creuses) et la membrane plasmique (flèche pleine), est d'environ 50 nm au niveau de la zone de contact. Cette distance est cohérente avec les longueurs additionnées de la dynéine (environ 30 nm) et la dynactine (24 nm). (A) extrait de (Babich and Burkhardt, 2011) (B) et (C) extraits de (Hashimoto-Tane et al., 2011).

Effet sur la sécrétion

Les CTL (comme les NK) peuvent détruire leur cible par une exocytose polarisée de vésicules qui contiennent des granzymes et des perforines. Le cytosquelette de microtubules et le MTOC jouent un rôle primordial dans la délivrance de ces molécules.

Après être produits dans le RE (réticulum endoplasmique), et avoir mûri dans l'appareil de Golgi, les granzymes et la perforine sont transportés dans des vésicules cytotoxiques (les granules) le long des microtubules. Le MTOC et ses microtubules ont la possibilité de se relocaliser très rapidement au niveau de la SI dans les CTL. Dans des cellules NK et NKT, qui possèdent aussi ce type de granules, l'équipe de GM. Griffiths a montré que le MTOC est amarré à moins de 500 nm de la membrane dans la majorité des cellules et que les microtubules qui en émanent filent étroitement sous la membrane. Cet arrangement facilite la délivrance polarisée des granules qui se déplacent le long des microtubules vers le pôle 'moins' (Stinchcombe et al., 2011).

Des images de microscopie électronique montrent que pour les CTL, lors de la formation de la synapse sécrétrice, l'appareil de Golgi se relocalise sous la membrane avec le MTOC et sont tous deux entourés de vésicules prêtes à être libérées (Bossi et al., 2002).

L'appareil de Golgi à partir duquel les molécules cytotoxiques sont synthétisées est en fait étroitement relié au MTOC grâce à des microtubules qui partent du MTOC. Son intégrité et son assemblage sont maintenues par des microtubules polymérisés non pas à partir du MTOC mais de l'appareil de Golgi lui-même. L'action concertée du MTOC et des microtubules est nécessaire pour l'assemblage l'intégrité et le positionnement de l'appareil de Golgi (Miller et al., 2009)(Kloc et al., 2014).

Le site de dégranulation est déterminé précisément par la position d'ancrage du MTOC à la membrane (Stinchcombe et al., 2006)(Stinchcombe et al., 2001).

La sécrétion des granules dans les CTL est permise par les actions concertées des deux moteurs antérogrades et rétrogrades des microtubules. Dans un premier temps, la dynéine (moteur rétrograde) transporte les granules des extrémités 'plus' des microtubules vers le MTOC, qui se trouve proche de la SI (Stinchcombe et al., 2006). Dans un deuxième temps, la kinésine (moteur antérograde) prend en charge ces vésicules pour les amener vers les extrémités 'plus' qui sont stabilisées au niveau de la SI. L'interaction entre les granules et la kinésine est permise par l'expression, à la surface des granules, de Rab27a qui peut interagir avec Slp3 (*synaptotagmin-like protein 3*), lui-même relié à la chaîne légère de la kinésine (Mentlik et al., 2010)(Kurowska et al., 2012).

Bien que la plupart des études montrent l'importance des microtubules et du MTOC dans la dégranulation, d'autres ont montré que la relocalisation du MTOC n'était pas indispensable.

Les CTL peuvent établir plusieurs contacts en même temps et polariser simultanément leurs granules vers ces cellules. L'équipe de S. Valitutti a montré de façon surprenante que les synapses peuvent même être postérieures à la dégranulation (Wiedemann et al., 2006).

Étant donné qu'à cette étape du cycle cellulaire, les CTL ne possèdent qu'un seul MTOC, on peut se demander si celui-ci se relocalise plusieurs fois aux zones de contact pour permettre la dégranulation ou si celle-ci a lieu indépendamment du MTOC. En analysant plus précisément l'organisation aux multiples zones de contact, cette même équipe a mis en évidence que la dégranulation pouvait survenir à des temps précoces alors même que le MTOC n'était pas relocalisé. A des temps plus tardifs, la polarisation du MTOC et une autre vague de dégranulation surviennent. Les effets lytiques sur la cellule cible ne sont pas altérés quand la dégranulation a lieu sans la présence du MTOC à la SI (Bertrand et al., 2013).

Un modèle à deux modes de dégranulation, régulés par la voie calcique, pourrait alors expliquer ce phénomène. Selon l'intensité, ce signal permet une lyse plus ou moins importante de la cellule cible. Les vésicules peuvent en fait prendre deux chemins distincts selon la force du signal : le chemin court mène les vésicules à être libérées au niveau du cSMAC alors que le chemin long les mène plutôt en périphérie dans le pSMAC. Quand les vésicules prennent le chemin le plus long, la dégranulation est plus lente à être

observée. Le chemin le plus court mène en revanche à une dégranulation plus rapide et se fait indépendamment de la relocalisation du MTOC (Beal et al., 2009).

Cette phase de dégranulation précoce indépendante de la relocalisation du MTOC doit probablement conférer un avantage pour les CTL en leur permettant d'avoir des effets cytotoxiques sur plusieurs cellules en même temps (Bertrand et al., 2013).

Dans les lymphocytes T CD4⁺ la sécrétion de cytokines semble également indépendante de la relocalisation du MTOC. Le cytosquelette de microtubules doit cependant rester intacte pour ce processus (Chemin et al., 2012).

3. TRAFIC VÉSICULAIRE À LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE

Le trafic vésiculaire, qui survient à la SI, dans les lymphocytes T effecteurs permet la délivrance des cytokines ou des molécules cytotoxiques vers la cellule cible. Les SI qui se forment dans les LT naïfs sont également un lieu de trafic intense.

Il y a encore quelques années, l'hypothèse admise, concernant la régulation du regroupement ou 'clustering' des TCR, était expliquée par une diffusion passive des TCR à la SI grâce au cytosquelette d'actine et d'une exclusion des molécules encombrantes (Grakoui et al., 1999)(Delon et al., 2001)(Finetti and Baldari, 2013). Les découvertes récentes montrant que des endosomes contenant des complexes TCR/CD3, LAT ou Lck, étaient constamment polarisés vers la SI ont révélé une voie inattendue, impliquée dans la régulation du signal. En modulant la concentration des récepteurs et des médiateurs de signalisation à la SI, mais également leur temps d'exposition à la surface, le trafic vésiculaire contribue à la fois à l'intensité et à la durée du signal émis (Finetti and Baldari, 2013).

A. LE RECYCLAGE DES ENDOSOMES EST NÉCESSAIRE POUR LE REGROUPEMENT DES TCR ET LA FORMATION DE LA SI

Recyclage du TCR

Il est intéressant de noter que dans les cellules T quiescentes, les complexes TCR/CD3 subissent un recyclage constitutif lent en passant par des compartiments vésiculaires. Ce mécanisme pourrait servir de contrôle qualité étant donné que la chaîne CD3 ζ a un caractère instable. Ces réserves de TCR intracellulaires suggèrent aussi que la cellule a le potentiel de réguler positivement l'exposition des TCR à sa surface (Geisler, 2004).

L'équipe d'A. Alcover a montré que ces vésicules de TCR recyclées, une fois exocytées à la SI lors de la formation d'un contact, peuvent être de nouveau recyclées. Ces vésicules sont guidées par les microtubules et fusionnent avec la membrane grâce aux protéines d'ancrage SNARE (Das et al., 2004).

L'internalisation des TCR est dépendante du TfR (récepteur à la transferrine) qui est impliqué dans les voies d'endocytoses. En effet, celui-ci se relocalise au niveau de la SI lors de la formation d'un conjugué. Des anticorps neutralisant son activité entraînent un défaut dans la formation des conjugués et le regroupement des TCR à la SI (Batista et al., 2004) (Das et al., 2004). Son mécanisme serait médié par son

interaction avec la chaîne CD3 ζ et les phosphorylation des tyrosines de cette chaîne suite à l'engagement du TCR (Salmerón et al., 1995).

Les TCR qui n'ont pas trouvé leur ligand à la SI peuvent être endocytés selon deux voies, une dépendante de la signalisation des TCR engagés et une autre dépendante d'une oligomérisation avec les TCR engagés. Cette dernière voie serait efficace pour permettre aux TCR non engagés de « revoir » la surface et avoir plus de chance de rencontrer leur ligand (San José et al., 2000). Ces mécanismes d'aller-retour permettent également à la cellule T de collecter un nombre important de signaux venant du TCR grâce au phénomène de « serial triggering » décrit au chapitre II.1.A.

Recyclage de LAT et Lck

Comme pour le TCR, les protéines LAT et Lck peuvent être présentes à la fois dans un pool membranaire et un pool vésiculaire intracellulaire (Ley et al., 1994)(Luton et al., 1997)(Bonello et al., 2004)(Williamson et al., 2011).

Les protéines Lck contenues dans des vésicules se relocalisent à la SI suite à l'engagement du TCR avec son agoniste (Ehrlich et al., 2002). La fusion des vésicules de Lck se fait indépendamment du signal calcique (Soares et al., 2013).

Concernant la protéine échafaudage LAT, le recrutement à la membrane à partir des vésicules est légèrement différent. Lors de la formation d'un contact, le pool présent à la membrane est mobilisé à la SI en quelques secondes, suivi du pool vésiculaire quelques minutes plus tard. Ce recrutement est dépendant des tyrosines phosphorylées contenues dans le domaine cytosolique de LAT (Bonello et al., 2004) mais également du signal calcique (Soares et al., 2013). Une étude plus récente, basée sur des expériences de microscopie à haute résolution, a montré que les clusters de LAT préexistants dans la membrane et qui convergent vers la SI ne sont pas responsables des événements précoces de signalisation. La signalisation précoce dépend en fait du recrutement et de la phosphorylation du pool contenu dans les vésicules subsynaptiques (Williamson et al., 2011)(Soares et al., 2013). D'autres études récentes renforcent cette hypothèse en montrant que les vésicules de LAT peuvent s'amarrer à la membrane, mais sans fusionner tout de suite, grâce à la protéine d'ancrage membranaire de la famille des v-SNARE, VAMP-7 (Larghi et al., 2013)(Soares et al., 2013). La fusion des vésicules de LAT ne survient qu'après celle des vésicules Lck (Soares et al., 2013).

La protéine MAL est aussi impliquée dans l'adressage de Lck et LAT à la membrane. Elle s'accumule à la SI dans les radeaux lipidiques et assure l'amarrage des vésicules à ce niveau-là (Antón et al., 2008)(Antón et al., 2011)(Soares et al., 2013).

En conclusion, la délivrance des vésicules de Lck à la SI pourrait provoquer un signal calcique qui induirait alors la libération de vésicules de LAT à la SI grâce aux protéines d'ancrage VAMP-7 et MAL (Soares et al., 2013).

La Figure 22 illustre la régulation des vésicules de TCR, Lck et LAT à la SI dans les LT.

B. RÉGULATION DU RECYCLAGE DES ENDOSOMES

Régulation par les RabGTPases

Le trafic vésiculaire est orchestré par une machinerie complexe de protéines adaptatrices, d'adressage, d'enveloppe et de fusion. Les RabGTPases sont des composantes de cette machinerie et permettent de définir les compartiments vésiculaires intracellulaires et les voies vers lesquelles les protéines sont destinées à être exportées.

Après leur internalisation, les vésicules sont marquées par la présence de Rab5 et peuvent être redirigées rapidement à la surface dans des vésicules marquées par Rab4 ou passer par une voie plus lente de recyclage marquée par Rab11. C'est cette dernière voie qui semble impliquée dans le recyclage des protéines de signalisation à la SI dans les lymphocytes T (Gorska et al., 2009)(Gorska and Alam, 2012)(Kumar et al., 2011).

Dans les cellules quiescentes, le complexe du TCR et LAT sont présents dans des compartiments marqués avec rab11 ce qui est cohérent avec leur recyclage lent qui a été observé à cette étape du cycle (Kumar et al., 2011)(Geisler, 2004)(Soares et al., 2013).

Rab35 est une autre RabGTPase impliquée dans le recyclage du TCR. Elle est retrouvée dans des vésicules contenant des TCR avec son partenaire GAP EPI64C. Une surexpression ou l'utilisation d'un dominant négatif d'une de ces deux protéines entraîne une altération du regroupement des TCR à la surface (Patino-Lopez et al., 2008).

Régulation par les cytosquelettes

Le réseau d'actine joue également un rôle dans le recyclage des vésicules. La NPF WASH (*WASP and SCAR homologue*), se localise dans les endosomes tardifs (marqués par Rab11). Elle peut interagir avec les microtubules et recruter Arp2/3 provoquant ainsi une polymérisation locale d'actine. Cela suggère que WASH pourrait réguler le trafic en ancrant les endosomes aux microtubules et en les faisant avancer grâce à la force motrice générée par la polymérisation de l'actine (Gomez and Billadeau, 2009)(Derivery et al., 2009).

Il a été montré récemment que le trafic de Lck nécessite un cytosquelette d'actine intacte et est régulé par Unc119 (*uncoordinated 119*) qui promeut l'activation de Rab11 et son recrutement à son effecteur : la myosine 5B (Gorska et al., 2009). Une mutation non-sens sur le gène Unc119 a été retrouvée chez une patiente souffrant d'une immunodéficiência sévère. L'interaction entre Unc119 et Lck est abolie dans les cellules T de cette patiente et cela entraîne un défaut de localisation de Lck dans les vésicules marquées par Rab11 et une réduction importante de l'activation (Gorska and Alam, 2012).

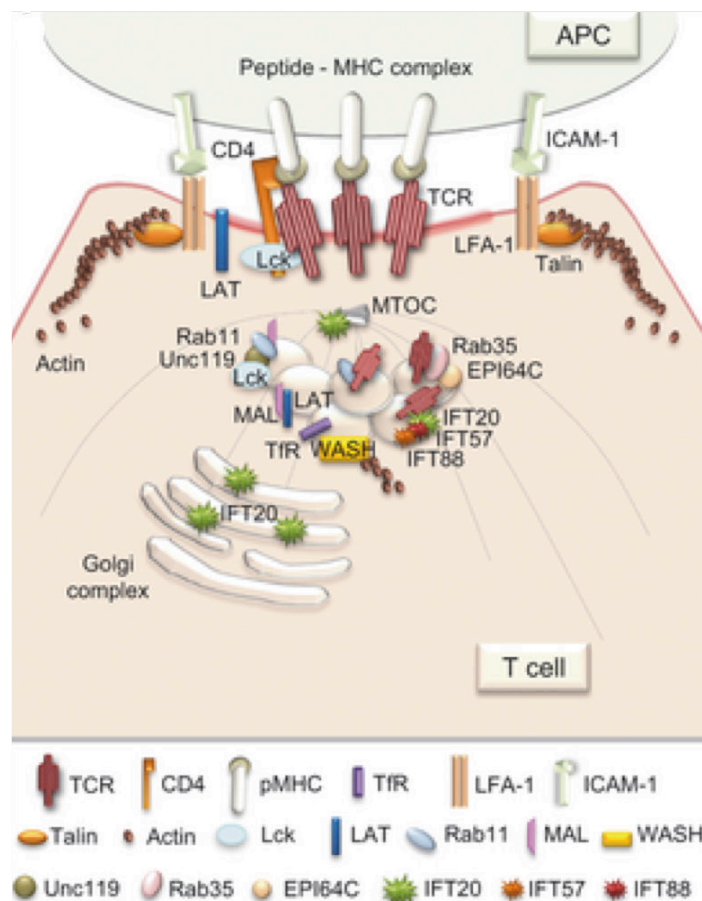


Figure 22: Trafic vésiculaire à la SI

Les pools intracellulaires de LAT et de Lck, présents dans les endosomes de recyclages (Tfr^+ et $Rab11^+$) sont relocalisés à la membrane vers les radeaux lipidiques grâce à la protéine d'adressage MAL. Unc119 également présent dans ces endosomes active Rab11 et peut interagir avec Lck. Les complexes de TCR peuvent être adressés à la SI grâce à la présence de Rab35 et d'EPI64C dans les endosomes. Suite à l'engagement du TCR à la surface, IFT20 peut aussi, en s'associant avec ses partenaires IFT57 et IFT88, entraîner le recyclage des complexes TCR. La NPF WASH entraîne une polymérisation locale de l'actine. Les radeaux lipidiques sont symbolisés par une ligne rouge plus épaisse au niveau de la SI. Extrait de (Finetti and Baldari, 2013).

C. LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE : UN CIL PRIMAIRE « FRUSTRÉ »

Composition et rôle du cil primaire chez les eucaryotes

Récemment la protéine IFT20 (*Intra-flagellar transport-20*) a montré un rôle dans la formation de la synapse immunologique (Finetti et al., 2009). Chez les mammifères, cette protéine assure l'assemblage et la maintenance du cil primaire. Son lien avec la SI était plutôt inattendu étant donné que les cellules T font partie des rares cellules de l'organisme à ne pas avoir de cil primaire (Finetti et al., 2011).

Le cil primaire est une excroissance membranaire retrouvée à la surface de la plupart des cellules des vertébrés, capable de « sentir » un large panel de signaux extracellulaires à travers de nombreux types de récepteurs. Il peut agir en tant que photo-senseur (dans les cellules en cônes et bâtonnets de la rétine), méchano-senseur (dans les néphrons au contact du flux urinaire), senseur biochimique (en présence de facteur de croissance dans l'environnement). Les voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la

différentiation, la survie et la migration sont également orchestrées dans le cil. Sa présence est couplée avec le cycle cellulaire puisqu'on l'observe uniquement lors des phases non-prolifératives. Le corps basal du cil séquestre en effet le centrosome qui est requis pour l'organisation du fuseau mitotique lors de la mitose (Finetti et al., 2011).

Sa structure s'organise autour d'un axonème composé de 9 filaments de microtubules et d'un corps basal qui contient le centrosome. La région intermédiaire composée de filaments moins stables permet de créer une barrière entre le corps de la cellule et son cil (Finetti et al., 2011).

Le cil peut être représenté comme une route à double-sens empruntées par des protéines multimériques qui jouent le rôle de cargo. Le trafic observé dans cette excroissance membranaire est destiné à transporter et recycler des récepteurs à l'extrémité du cil, qui vont assurer sa fonction (Finetti et al., 2011).

Le mouvement antérograde (vers l'extrémité du cil) est assuré par la kinésine-2 alors que le mouvement rétrograde (vers la base du cil) est réalisé par la dynéine-1b. Pour atteindre le cil et franchir la barrière de la zone intermédiaire, les protéines doivent être associées avec IFT20 dès leur sortie de l'appareil de Golgi dans les vésicules. Arrivées à la base du cil, IFT20 (couplé aux protéines destinées au cil) va s'associer avec d'autres composants pour former un complexe IFT. La kinésine peut alors interagir avec ce complexe et hisser les protéines jusqu'à l'extrémité du cil (Pedersen and Rosenbaum, 2008).

Les IFT jouent un rôle dans le trafic vésiculaire à la SI

Bien que n'ayant pas de cil primaire, les cellules T présentent plusieurs points communs avec cette structure au niveau de la SI. Premièrement, elles sont toutes deux associées à une relocalisation du centrosome et de l'appareil de Golgi. Deuxièmement, elles jouent le rôle de plateforme de signalisation avec une membrane enrichie en radeaux lipidiques et de nombreuses protéines impliquées dans la génération de cascade de signalisation. Enfin, ce sont des sites de trafics vésiculaires intenses où l'exocytose est guidée vers des zones spécifiques. Ces similitudes ont mené la SI à être comparée à un cil primaire « frustré » (voir Figure 23) (Griffiths et al., 2010)(Finetti et al., 2011).

Les cellules T, qui expriment la protéine IFT20 malgré une absence de cil, montrent une relocalisation de cette dernière à la SI quand elle fait un contact avec une CPA chargée en antigène. IFT20 est également présent au niveau de l'appareil de Golgi et du centrosome. Le regroupement des TCR à la SI, important pour le maintien de la signalisation, est dépendant de cette protéine. Une extinction d'IFT20 par une approche de siRNA entraîne un blocage de la phosphorylation des tyrosines à la synapse (Finetti et al., 2009).

Comment IFT20 peut-il promouvoir le regroupement des TCR à la SI ? Un des mécanismes qui permet ce regroupement à la membrane est centré sur le recyclage comme vu dans le chapitre ci-dessus. IFT20 semble être impliqué dans ces voies étant donné qu'il se localise au niveau des endosomes de recyclage avec ses partenaires IFT57 et IFT88 et que son extinction entraîne une diminution de l'export du TCR à la surface (voir Figure 23b) (Finetti et al., 2009).

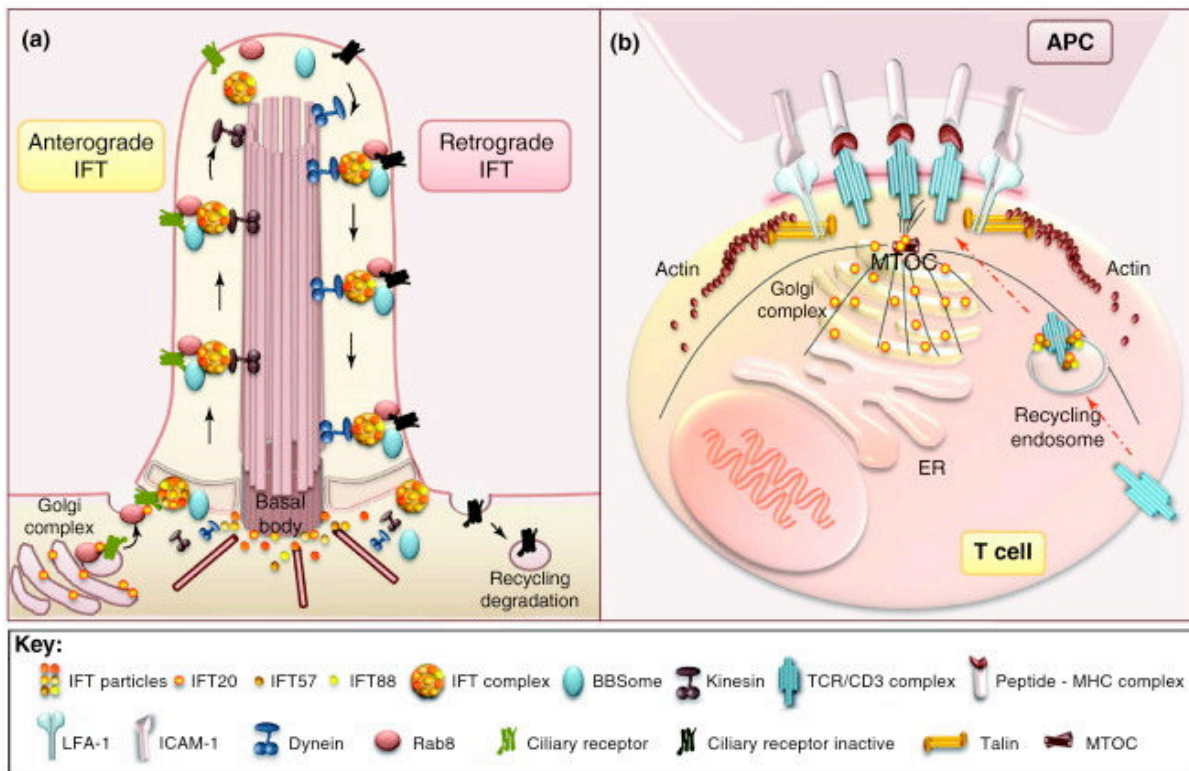


Figure 23: Comparaison du cil primaire et de la synapse immunologique

(a) Les récepteurs cytosoliques destinées au cil sont guidées vers la base grâce à IFT20 déjà présent au niveau de l'appareil de Golgi. La petite GTPase Rab8 est impliquée dans l'exocytose. Une fois à la base du cil, le récepteur couplé à IFT20 peut franchir la zone intermédiaire grâce à la formation d'un complexe IFT avec IFT57 et IFT88 et sa liaison avec la protéine BBSome. Une fois dans l'espace du cil, le complexe IFT est pris en charge par un moteur moléculaire (la dynéine-1b ou la kinésine 2) qui est responsable de son mouvement le long de l'axonème. (b) Suite à l'engagement du TCR, IFT20 se relocalise au niveau des pools de TCR intracellulaires et forme un complexe avec IFT57 et IFT88. Ce complexe guide le recyclage des TCR vers la SI. Dans des cellules quiescentes et des cellules qui forment des SI, IFT20 est également retrouvé au niveau du centrosome, et de l'appareil de Golgi. Extrait de (Finetti et al., 2011).

Étant donnée la concentration importante de récepteurs qui s'y trouvent, la synapse, tout comme le cil primaire, peut aussi servir d'antenne pour capter un grand nombre de signaux extracellulaires. Dans le cas de ces deux structures, des signaux prolongés doivent être perçus. L'évolution a sélectionné des mécanismes permettant le renouvellement des récepteurs de l'antenne ou de la synapse et leur transport depuis l'intérieur de la cellule jusqu'à cette zone. Cette similitude fonctionnelle, pourrait expliquer que, malgré leurs différences structurales, l'on retrouve des molécules communes comme un cytosquelette polarisé et IFT20.

V. L'ANTISYNAPSE, UNE PRÉ-SYNAPSE AU POLE OPPOSÉ À CELUI DE LA SYNAPSE

L'interaction entre une CPA et un LT mène à un ensemble d'événements moléculaires qui prennent place au niveau de la zone de contact, la synapse immunologique.

Certaines études, relevées dans la littérature et décrites ci-dessous, relatent cependant une relocalisation paradoxale de protéines au pôle opposé à celui de la synapse immunologique.

1. LOCALISATIONS PARADOXALES DE PROTÉINES DE SIGNALISATION DANS LES LYMPHOCYTES T

A. LE CAP

Le canal calcique Orai1 peut se rapprocher du senseur calcique STIM1 pour former une structure à l'avant nommé « le *puncta* » ou à l'arrière « le *cap* ». Le *cap* apparaît dans plus de 25% des conjugués. Il a été observé entre des cellules T murines et des LB chargés en antigènes ainsi que dans des cellules T Jurkat et des LB Raji chargés en antigènes ou sur des lamelles recouvertes d'anti CD3 (Barr et al., 2008). L'interaction entre STIM1 et Orai1 apparaît plus intense au *cap* qu'au *puncta* dû probablement à l'accumulation de STIM1 plus importante à ce pôle (Figure 24) (Barr et al., 2008).

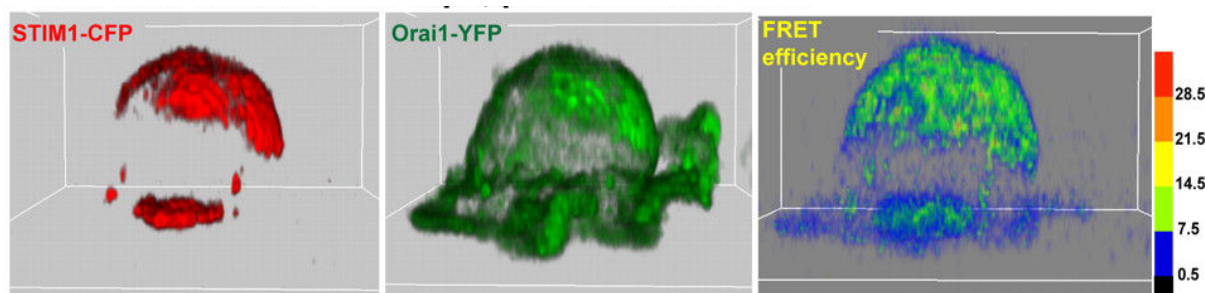


Figure 24: Interaction entre STIM1 et Orai1 au *puncta* et au *cap*.

Reconstruction 3D d'une cellule Jurkat transfectée avec Orai-YFP et STIM1-CFP déposée sur une surface recouverte d'un anticorps anti-CD3. Le panneau de droite représente la proximité entre ces deux protéines (efficacité du FRET).
Extrait de (Barr et al., 2008).

La formation des Caps, qui survient 5 à 15 min après le contact, est dépendante de l'activation du TCR, d'une phosphorylation des tyrosines par les Src et de l'intégrité du cytosquelette d'actine. Elle est en revanche indépendante de la déplétion des stocks du RE et du flux calcique provenant du milieu extracellulaire. Une telle structure, observée dans de nombreux modèles, pourrait avoir une implication dans l'activation. Elles pourraient séquestrer les CRAC dans des zones précises loin de la SI pour concentrer la réponse calcique à l'avant. Elles pourraient sinon apporter une réponse calcique modérée dans cette zone (Barr et al., 2008). Cependant, cette réponse resterait modérée en raison de l'absence de mitochondries à ce pôle, car recrutées à la SI, dont un des rôles est d'atténuer le retrocontrôle négatif du Ca^{2+} sur STIM1 (Quintana et al., 2006).

B. LE *DISTAL POLE COMPLEX*

CD43 est une sialoprotéine très abondante qui peut recouvrir jusqu'à 28% de la surface d'une cellule T. Elle peut dépasser de 45 nm à la surface, ce qui en fait une des plus grande protéines des cellules T (Cyster et al., 1991). L'équipe de J.K. Burkhardt a montré en 1998 que CD43 était toujours exclu de la synapse immunologique très rapidement après le début d'un contact et que ce mouvement était dépendant du signal TCR (Sperling et al., 1998). Quelques années plus tard, cette même équipe a montré que CD43 était exclu selon un mécanisme actif impliquant les protéines ERM (ezrine, radixine, moesine) et qu'il se concentrait dans une zone à l'arrière de la synapse que les auteurs ont appelé le DPC (*distal pole complex*) (Allenspach et al., 2001) (Figure 25 A). Il est important de noter que cette structure n'a cependant été observée que dans des cellules murines et jamais dans des cellules humaines.

CD43 possède dans sa queue cytoplasmique trois acides aminés basiques important pour sa liaison avec les ERM (Yonemura et al., 1998). L'ezrine, la radixine et la moesine sont un groupe de 3 protéines capables de faire le lien entre des protéines cytoplasmiques ou membranaires et le cytosquelette. L'équipe de J.K. Burkhardt a montré que CD43 était présent en même temps que l'ezrine et la moesine au DPC (Allenspach et al., 2001).

Indépendamment et au même moment, l'équipe de R.N. Germain a confirmé ces résultats en apportant d'autres éléments pour expliquer sa localisation. Dans des cellules T isolées, CD43 est exprimé à la surface et ancré indirectement au cytosquelette grâce à son interaction avec la moesine phosphorylée. Le signal TCR entraîne une déphosphorylation transitoire de la moesine une minute après le contact. CD43 est alors libéré de son attachement avec le cytosquelette ce qui a pour conséquence d'augmenter sa mobilité dans la bicouche lipidique. La moesine, de nouveau phosphorylée 5 à 10 minutes après le contact, permet un ré-ancrage de CD43 au cytosquelette après son exclusion de la synapse. Cette exclusion de la synapse est bénéfique pour l'activation puisque l'utilisation de mutants de CD43 incapables de lier la moesine, et par conséquent d'être exclu de la synapse, provoque une réduction de 40% de la production d'IL-2 (Delon et al., 2001) (Figure 25 B).

Le DPC, en séquestrant CD43 loin de la SI aurait un rôle positif dans l'activation (Allenspach et al., 2001). Le caractère inhibiteur de CD43 serait provoqué par l'encombrement stérique et l'espacement qu'elle imposerait au niveau de la synapse immunologique (Cyster et al., 1991).

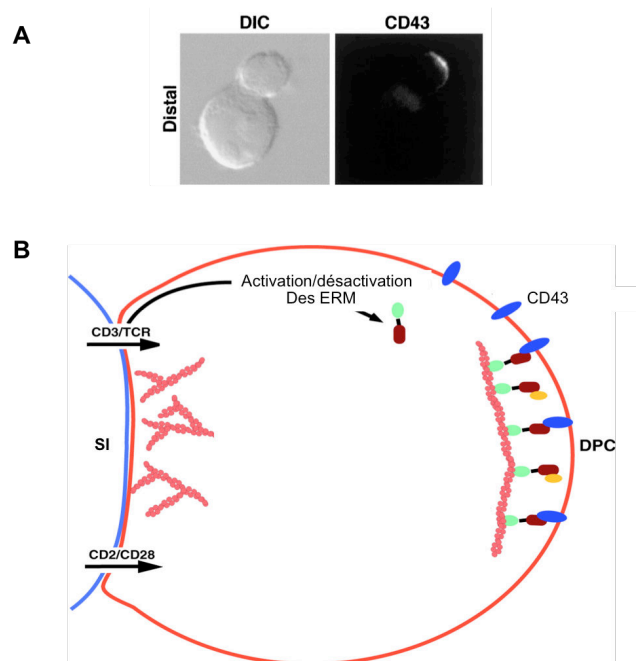


Figure 25: Le *Distal pole complex*

(A) Contact entre une cellule T murine DO.11.10 et une cellule B murine A20 chargée en antigène. CD43 est relocalisé à l'arrière du contact. Ces cellules sont en contact depuis 20 à 25 min. Extrait de (Allenspach et al., 2001). (B) Mécanisme de relocalisation de CD43 à l'arrière grâce à la déphosphorylation et rephosphorylation des ERM en réponse à un signal TCR. Adapté de (Huang and Burkhardt, 2007).

C. LA SYNAPSE DISTALE

Bien que la PKC- θ soit requise à la SI pour l'activation et l'activité effectrice des lymphocytes T_{eff} , la situation est différente dans les lymphocytes T_{REG} . L'équipe de M. Dustin a mis en évidence, sur des bicouches lipidiques, que la PKC- θ est six fois moins présente au niveau de la SI et se relocalise au pôle opposé (Figure 26). Ce mécanisme permettrait de séquestrer loin de la SI cette kinase pour favoriser l'activation des T_{REG} . En effet, dans ces cellules la PKC- θ semble être un régulateur négatif de l'activation puisque son inhibition améliore les fonctions suppressives des T_{REG} quand elles sont stimulées par le TCR (Zanin-Zhorov et al., 2010).

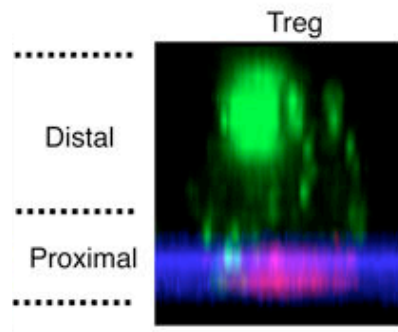


Figure 26: Distribution de la PKC- θ à la synapse distale dans des T_{REG}

Vue de côté d'une cellule T_{REG} humaine déposée sur une surface recouverte d'anti CD3 et d'ICAM-1. Le marquage ICAM-1 est représenté en bleu, anti-CD3 en rouge et la PKC- θ en vert. La cellule a été fixée 6 min après le contact avec la surface. Extrait de (Zanin-Zhorov et al., 2010).

2. DÉCOUVERTE DE L'ANTISYNAPSE

Clotilde Randriamampita et Annemarie Lellouch ont développé en 2008 un senseur de l'activité de ZAP70 basé sur le système du FRET, ROZA (*Reporter of ZAP-70 activity*). Elles ont pu mettre en évidence, une activité de ZAP70 d'une part à la synapse immunologique mais aussi de façon transitoire au pôle opposé à celui de la synapse qu'elles ont appelé « antisynapse ». Cette activité est détectée dès les premières secondes après le contact (Randriamampita et al., 2008) (Figure 27).

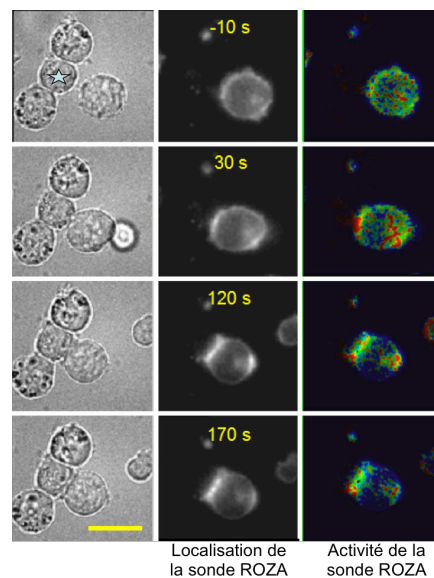


Figure 27: Activité de ROZA à la synapse et à l'antisynapse

Séquence d'événements qui surviennent lors de l'interaction entre une cellule T Jurkat transfectées avec la sonde ROZA et une cellule Raji chargée en super-antigène. Sur le panneau de droite l'activité de ROZA est codée en fausses couleurs. Le bleu symbolisant une zone de faible activité et le rouge de forte activité. Barre d'échelle : 10 μ m. Le temps zéro correspond au temps initial de contact basé sur les images en lumière transmise. Extrait de (Randriamampita et al., 2008).

L'antisynapse a été étudiée par Damien Jullié lors de son stage au laboratoire en 2008 pour sa 2^{ème} année de master. Son travail a consisté à déterminer quelles protéines étaient présentes au sein de l'antisynapse. Il a notamment détecté la présence de CD3, Lck, du messenger secondaire PIP₃ et de la sous unité P85 de la PI3K (Figure 28). Il a aussi regardé la localisation d'une protéine formée des treize premiers acides aminés en N terminal de Lck murin (permettant son ancrage membranaire dans les radeaux lipidiques) couplés à la GFP (*Green Fluorescent Protein*). Cette protéine de fusion qu'on nommera ici « mLck-GFP » présente une distribution identique à celle de Lck couplée à la GFP ainsi qu'un bon recrutement à l'antisynapse et à la synapse.

Dans plus de 80% des conjugués productifs, c'est à dire ceux aboutissant à la formation d'une synapse, tous ces marqueurs, à l'exception de la chaîne CD3 ζ , ont été retrouvés à l'antisynapse. La présence de ces protéines à ce pôle, a de quoi interpeller puisque toutes sont impliquées dans la formation du signalosome à la SI.

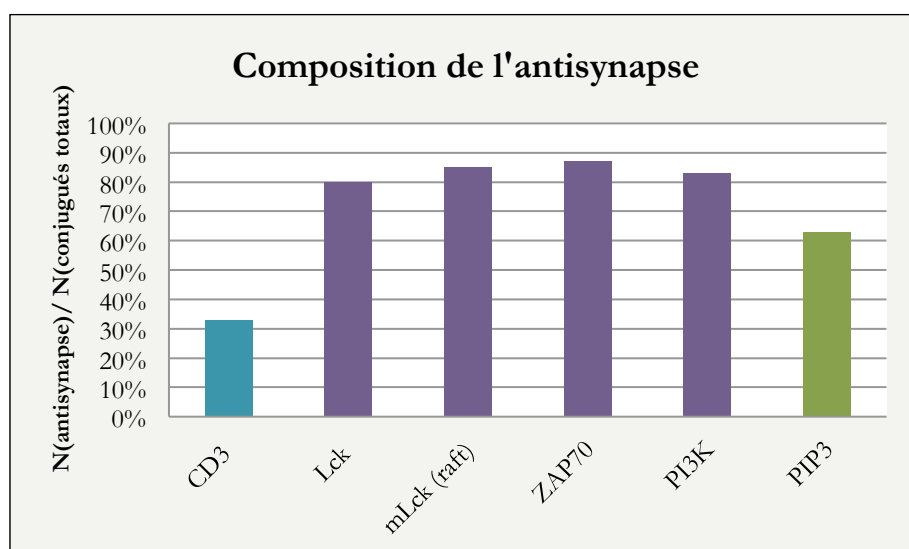


Figure 28: Composition de l'antisynapse

Par vidéo-microscopie, observation du pourcentage de conjugués Raji-Jurkat avec antisynapses parmi tous les conjugués. Différents marqueurs ont été utilisés, la chaîne CD3 ζ , les kinases Lck, ZAP-70 et la PI3K, le messenger secondaire PIP₃ et une protéine qui s'ancore dans les rafts : mLck.

Mes travaux de thèse ont porté sur la caractérisation de l'antisynapse. Nous avons d'abord approfondi nos connaissances sur sa composition et sa cinétique par l'observation de formations de conjugués en vidéo-microscopies en champ-large et de conjugués fixés en microscopie confocal. Les régulateurs qui contrôlent sa formation et sa disparition ont également été étudiés. Enfin nous nous sommes intéressés au rôle qu'elle pourrait avoir sur la formation de la synapse immunologique qui lui succède.

RÉSULTATS

I. RÉSULTATS SUR L'ANTISYNAPSE

1. ACCUMULATION DE PROTÉINES DE SIGNALISATION À L'ANTISYNAPSE

Étant donné que la protéine ZAP-70 (activée) a déjà été observée à l'antisynapse (Randriamampita et al., 2008), nous avons observé la distribution d'autres molécules impliquées dans la signalisation précoce du TCR. Comme montrée dans la Figure 29, une accumulation antisynaptique peut être observée pour : Lck, la PLC γ , la PI3K et LAT. De plus, comme la synapse, l'antisynapse correspond à une région enrichie en radeaux lipidiques, comme montré par le recrutement du petit peptide mLck, composé des treize premiers acides aminés de Lck qui permettent son ancrage dans les radeaux lipidiques. Un enrichissement du phosphoinositide PIP₂ peut aussi être observé à l'antisynapse, comme à la synapse (Figure 30A). Nous avons aussi montré une accumulation de tyrosines phosphorylées (Figure 29A) et d'ERK phosphorylé (Figure 30A), suggérant ainsi que les kinases sont actives à ce pôle. Cela confirme et renforce les résultats obtenus précédemment avec la sonde ROZA (Randriamampita et al., 2008).

L'antisynapse peut-être observée non seulement dans des conjugués Raji-Jurkat (Figure 29A) mais aussi dans des cellules primaires. Les contacts entre les cellules T humaines primaires et des cellules dendritiques primaires humaines (CD) non chargées en antigènes exogènes, provoquent même la formation d'antisynapses dans les cellules T (Figure 29B). Une telle structure peut aussi être détectée *in situ* dans des tranches de ganglions lymphatiques murins, lors des conjugués formés entre des cellules T et des cellules B ou des CD (Figure 29C).

De manière intéressante, la plupart des antisynapses montrant une accumulation de tyrosines phosphorylées, présentent aussi un recrutement de l'adaptateur LAT. Les antisynapses avec une accumulation de mLck, présentent elles aussi un recrutement de LAT. Ces résultats sont renforcés par les expériences de détection de proximité de liaison. Cette technique permet de détecter la proximité entre deux molécules, à condition qu'elles soient à une distance inférieure à 40 nm l'une de l'autre. Comme montré dans la Figure 30B, des signaux positifs de proximité peuvent-être détectés pour les couples LAT/Lck et LAT/PLC. Tous ces résultats suggèrent que l'antisynapse pourrait constituer un lieu où se forment des complexes de signalisation proches des signalosomes déjà observé à la synapse.

Le *distal pole complex* (DPC), est une structure qui a également été observée au pôle opposé à celui de la synapse (Cullinan et al., 2002). Cependant, contrairement à l'antisynapse, le DPC se caractérise par une accumulation de protéines de signalisation inhibitrices, qui dans certaines conditions, peuvent être tenues à l'écart de la synapse. C'est le cas par exemple de CD43, un marqueur clé du DPC, qui ne s'accumule pas à l'antisynapse (Figure 30C).

Les antisynapses sont fréquemment associées à une déformation membranaire ressemblant à un bourgeon ou à un cil (Voir les flèches blanches dans la Figure 29 ainsi que dans les suivantes). En effet, $78 \pm 4\%$ des antisynapses (n=4 expériences indépendantes, 13-33 conjugués/condition) montrent cette protrusion membranaire. Cette déformation qui se forme clairement après le contact et simultanément avec l'antisynapse, ne correspond pas à un résidu d'uropode.

Associée avec l'accumulation des protéines de signalisation, nous avons observé une nette augmentation de la présence d'actine filamenteuse au niveau de ces protrusions (Figure 29A, Figure 34).

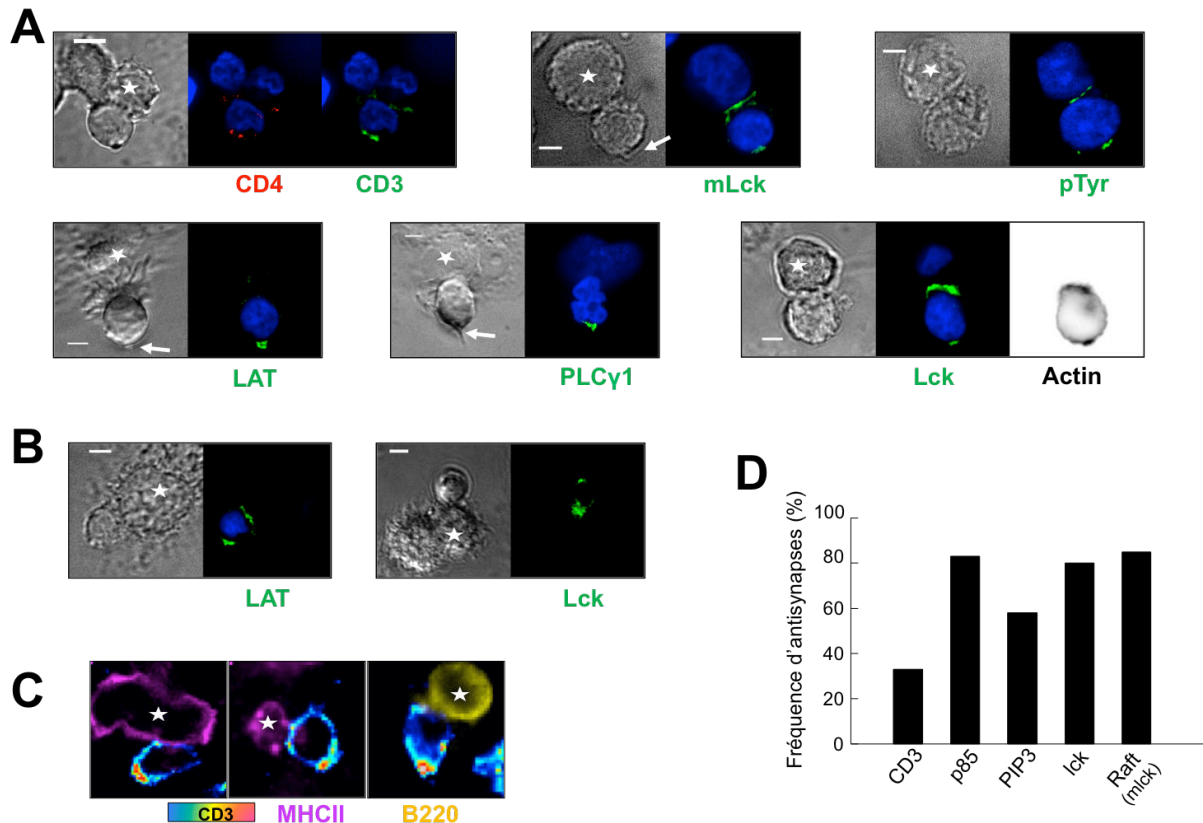


Figure 29: Composition de l'antisynapse

Immuno-marquages réalisés entre 3 et 5 minutes dans des conjugués T/CPA de cellule T Jurkat et de cellule B Raji (A), cellule T primaire humaine et cellule dendritique mature (B), cellule T murine et cellule B (C panneau de droite) ou cellule dendritique (C deux panneaux de gauche) dans une tranche de ganglion lymphatique. Dans (A), (B panneau de gauche) et (D), les CPA ont été chargées avec 200ng/mL de SAg. Les autres conjugués ont été formés en absence de SAg. Les flèches blanches indiquent les déformations morphologiques des cellules T, associées avec la présence d'antisynapses. Les noyaux sont marqués avec du Hoechst (bleu). Le marquage du cytosquelette d'actine est présenté en nuances de gris inversées. Dans (C), l'intensité du marquage CD3 est codée avec la gamme de couleur pseudo-color. (D) La fréquence des antisynapses pour chaque marqueur a été quantifiée lors d'expériences réalisées en vidéo-microscopie, en ne prenant en compte que les conjugués productifs, c'est à dire, ceux dont le même marqueur est ensuite recruté à la synapse. La production de PIP₃ a été observée à l'aide de la construction AKT-PH et les radeaux lipidiques (rafts) avec mLck. 6-20 conjugués/marqueurs.

Les CPA sont indiquées par une étoile. Barre d'échelle = 5µm.

Nos observations sur les conjugués fixés ont été complétées par des expériences de vidéo-microscopie qui nous ont permis de suivre en fonction du temps, la distribution de protéines exprimées et marquées dans la cellule T. Cette expérience est présentée dans la Figure 29D, où la fréquence des antisynapses a été quantifiée dans des conjugués productifs, c'est-à-dire ceux qui mènent à la formation de synapses. Dans une large majorité de ces conjugués, les protéines marquées s'accumulent à l'antisynapse avec des

fréquences similaires (environ 80 %), avec une exception pour la chaîne CD3 ζ qui s'accumule à l'antisynapse seulement dans 30 % des conjugués productifs.

En conclusion, ces résultats montrent que l'antisynapse est une structure qui apparaît fréquemment et qui contient tous les composants du signalosome, habituellement retrouvés à la synapse. Nous avons également montré ici que l'accumulation des protéines de signalisation pouvait se faire indépendamment de la présence de CD3.

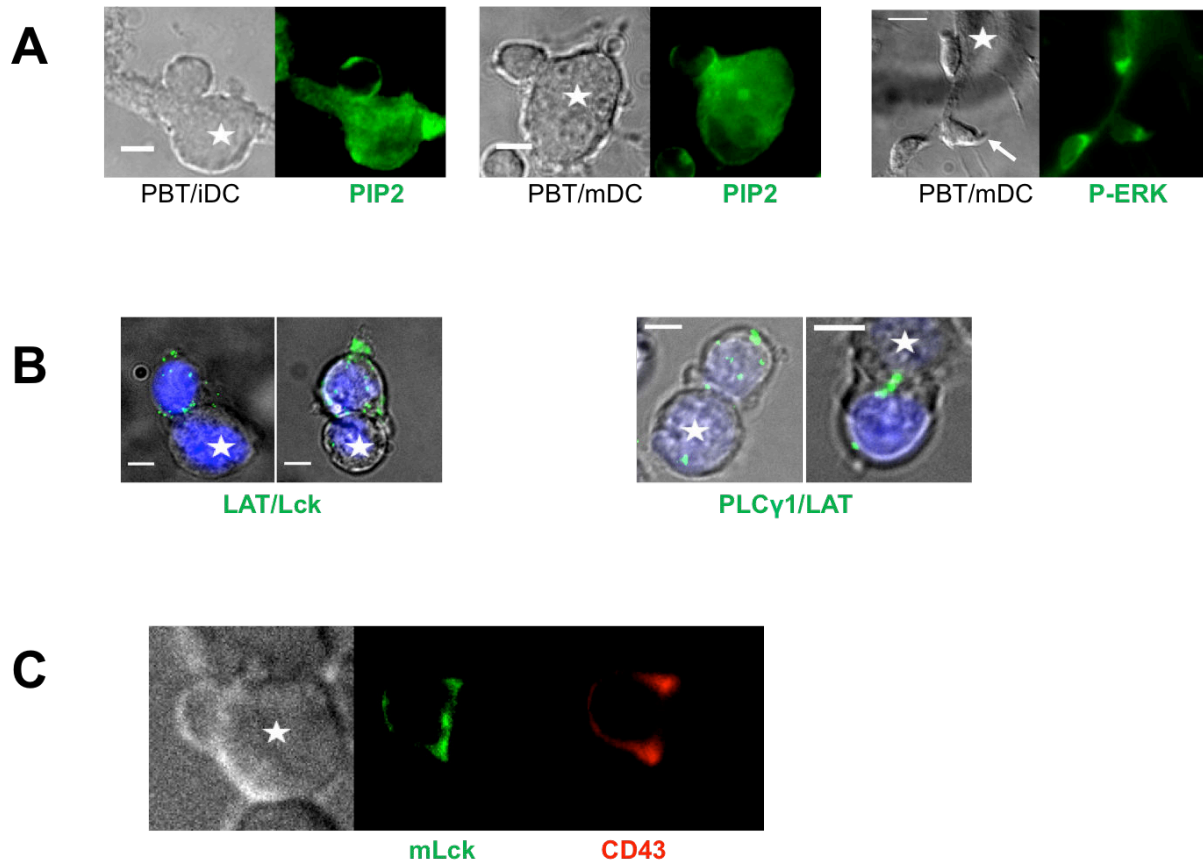


Figure 30: Composition de l'antisynapse (suite)

(A) Exemples d'antisynapses composées de PIP₂ (gauche) et de phospho-ERK, observées dans des conjugués formés entre des cellules T primaires humaines et des cellules dendritiques immatures (iDC) ou matures (mDC). La flèche blanche indique la déformation morphologique associée avec la présence d'une antisynapse dans la cellule T. (B) Exemples d'images obtenues avec les expériences de détections de proximité de liaison réalisées sur les couples LAT + Lck (gauche) ou PLC γ 1 + LAT (droite) dans des conjugués cellules T Jurkat/cellules B Raji. Les points verts indiquent les lieux où les deux protéines du couple sont proches de moins de 40 nm. Les images en lumière transmise ont été superposées avec les images des projections en z des signaux de proximité (vert). (C) Exemple de conjugué formé entre une cellule B Raji et une cellule T primaire exprimant mLck. La distribution perisynaptique de CD43 est clairement distincte de celle de mLck. Les CPA sont indiquées par des étoiles. Barre d'échelle= 5 μ m.

2. LA CINÉTIQUE DE L'ANTI SYNAPE

Afin de déterminer la cinétique de l'antisynapse, nous avons réalisé des expériences sur des conjugués qui ont été synchronisés, par centrifugation des cellules T exprimant mLck sur des CPA. Comme montrée dans la Figure 31A, l'antisynapse est une structure transitoire, puisqu'en quelques minutes, l'intensité de mLck décroît à l'antisynapse tandis qu'elle se stabilise à la synapse. Il faut noter cependant, que la cinétique de la formation de l'antisynapse est trop rapide pour être mesurée par cette approche. Nous sommes alors passés à des expériences en vidéo-microscopie (Figure 31B et C). Dans ces expériences, la mesure du calcium intracellulaire (Ca) a été utilisée comme témoin d'activation des cellules. Dans les images extraites d'un film qui suit la formation d'un contact entre un LT et une CPA, présentées en Figure 31B, on peut voir que le début du contact mène à une augmentation rapide de calcium et une accumulation de mLck d'abord à l'antisynapse, puis une minute plus tard à la synapse. L'antisynapse disparaît ensuite et l'intensité à la synapse devient alors de plus en plus intense. Ces événements ont été quantifiés en mesurant l'intensité du marqueur aux deux zones (la synapse et l'antisynapse) en fonction du temps. On peut voir ici que la présence du marqueur à l'antisynapse est un événement précoce et transitoire tandis que son accumulation synaptique est retardée et soutenue. Les cinétiques de distribution de mLck à la synapse et à l'antisynapse ont été mesurées et regroupées pour plusieurs conjugués (Figure 31C). Dans toutes nos mesures, nous avons considéré que le temps initial correspondait à celui où les membranes des deux cellules se touchaient pour la première fois (basé sur les films en lumière transmise). Alors que les antisynapses apparaissent en moins d'une minute après que la cellule T ait touché une CPA, et légèrement avant le signal calcique, les synapses apparaissent bien plus tardivement.

Nous avons ici montré, que l'antisynapse est une structure transitoire, qui ne dure que quelques minutes, et qui apparaît avant la synapse immunologique

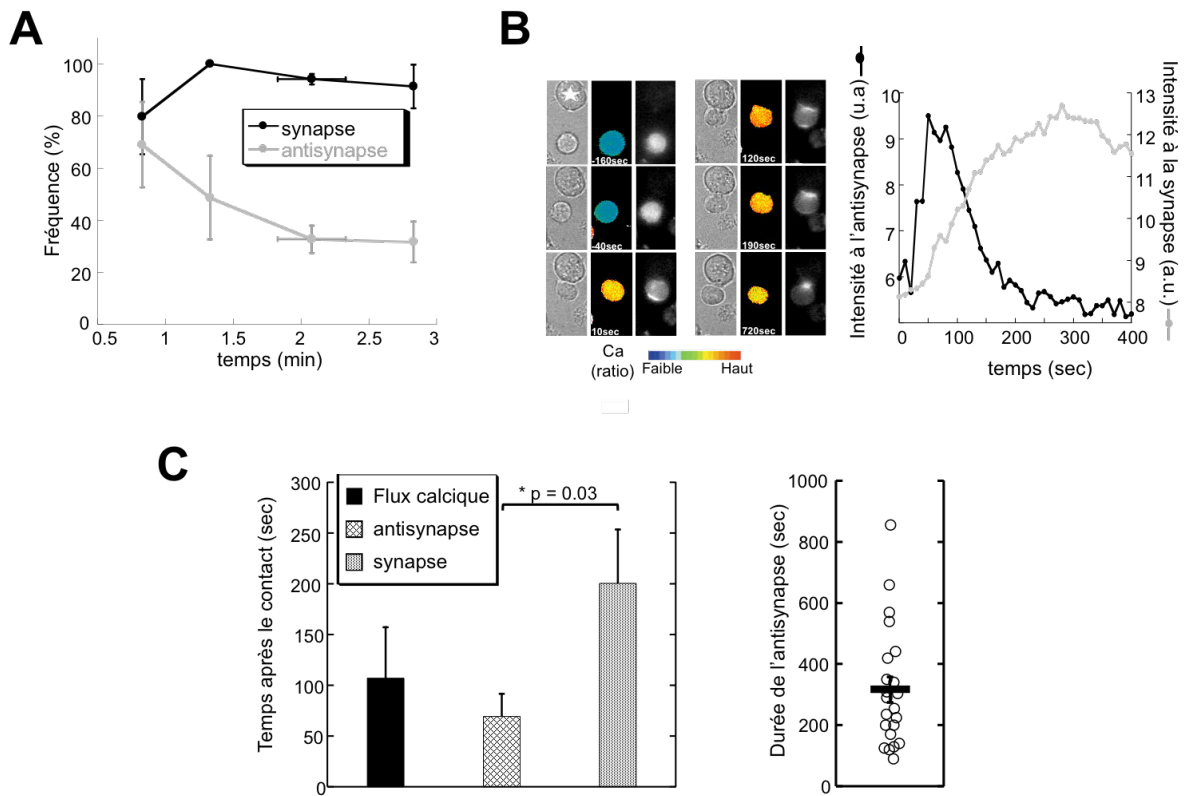


Figure 31: Cinétique de l'antisynapse

La cinétique de l'antisynapse a été mesurée dans des cellules T Jurkat exprimant mLck et formant des conjugués avec des cellules B Raji chargées en SAg. (A) les cellules T ont été centrifugées avec des cellules B raji pendant 5 secondes, et les conjugués ont été fixés à différents temps (moyenne de trois expériences indépendantes, 8 à 18 conjugués/condition/temps pour chaque expérience). Les synapses et antisynapses ont été définies par la présence de mLck au deux zones. (B,C) Des cellules T Jurkat chargées en Fura-2, ont été ajoutées à des cellules B Raji et les conjugués ont été analysés par vidéomicroscopie. (B) Exemple des mesures effectuées sur un seul conjugué, du flux calcique (gauche) et la distribution de mLck à l'antisynapse et à la synapse (droite). L'étoile indique la CPA. (C) Quantification des délais d'apparition, après le contact initial, du flux calcique, de la formation de l'antisynapse et la synapse (12 conjugués) ainsi que la durée de l'antisynapse (22 conjugués).

3. QUEL EST LE DESTIN DES PROTÉINES À L'ANTISYNAPSE ?

Nous avons ensuite regardé ce qu'il advenait des composants des complexes de signalisation antisynaptiques, après leur disparition. Pour cela, nous avons utilisé des cellules T exprimant un marqueur synaptique/antisynaptique, Lck couplé à la Dendra2, une protéine photo-convertible (Chudakov et al., 2007). Comme montré dans la Figure 32A, après un flash UV ciblé sur l'antisynapse (point bleu), les protéines de Dendra-2 peuvent passer d'une émission dans le vert à une émission dans le rouge (Flèche jaune sur la seconde ligne). Suite à la photo-conversion à l'antisynapse, des molécules photo-converties (qui émettent donc dans le rouge), s'accumulent à la synapse en quelques secondes (Flash jaune sur la troisième ligne), témoignant d'un transfert efficace de molécules de signalisation de l'antisynapse vers la synapse. Quelques minutes plus tard, toutes les molécules photo-converties s'accumulent au niveau de la synapse.

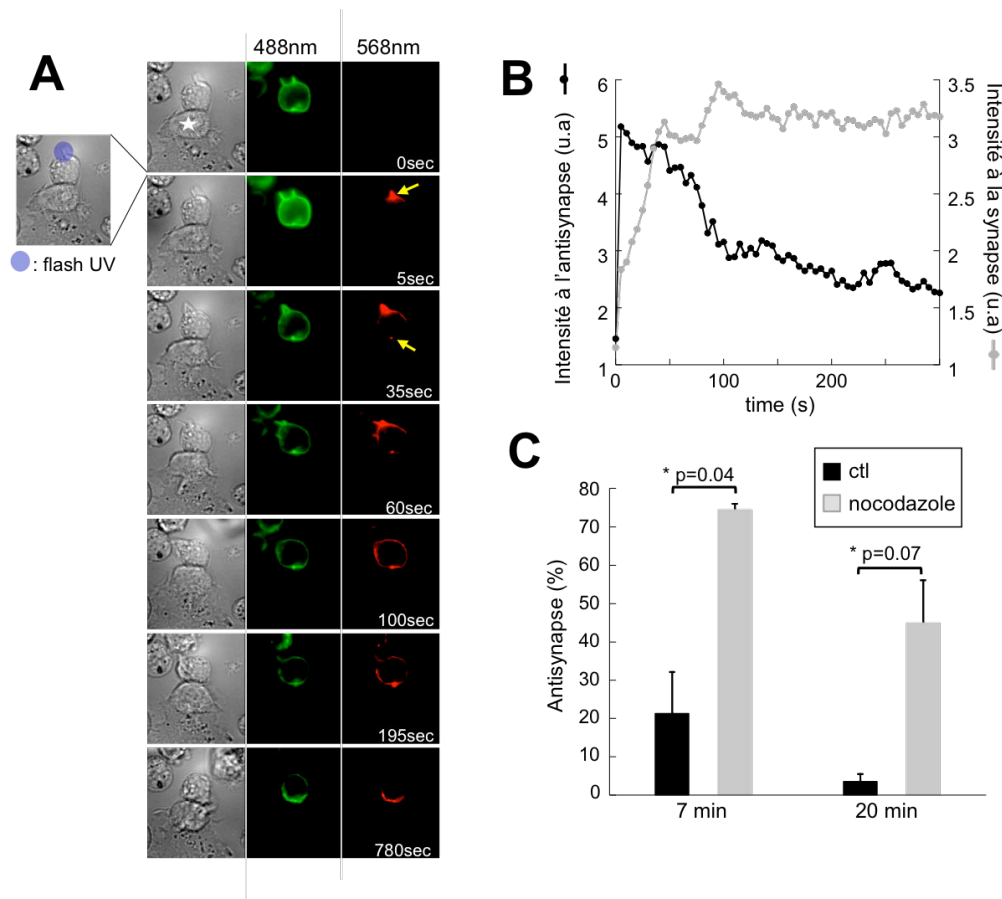


Figure 32: L'antisynapse disparaît au profit de la synapse

(A) Les cellules T jurkat transfectées avec Lck-Dendra2 ont été ajoutées à des cellules B Raji. Lck-Dendra2, suivi par une excitation à 488 nm a été converti avec un flash à 405 nm ciblé sur l'antisynapse (point bleu). Les protéines Lck-Dendra2 photo-converties, suivies par l'excitation à 568 nm, sont initialement observées à l'antisynapse (première flèche jaune) puis rapidement détectées à la synapse (seconde flèche jaune). L'étoile indique la CPA. (B) L'intensité moyenne de fluorescence des protéines photo-converties a été quantifiée à l'antisynapse et à la synapse. (C) La distribution de LAT a été mesurée dans des conjugués formés entre des cellules T jurkat prétraitées ou non avec 10 μ M de nocodazole et des cellules B Raji, en contact ensemble depuis 7 ou 20 minutes. La fréquence des antisynapses a été calculée sur les conjugués productifs, c'est-à-dire ceux qui font ensuite une synapse. Moyenne \pm SE de trois expériences indépendantes, 8-18 conjugués/condition/expérience.

Ce phénomène est quantifié en Figure 32B. Ce type d'expérience permet de suivre directement la relocalisation des composants de la synapse et se révèle être le meilleur moyen pour étudier le devenir des protéines à l'antisynapse. Cette expérience est cependant délicate à mettre en œuvre d'un point de vue technique et ne peut pas être effectuée systématiquement. Par conséquent, nous avons choisi de regarder la présence des protéines à l'antisynapse dans des images de conjugués prises à des temps tardifs (> 7 minutes).

Comme attendu, à des temps tardifs, la fréquence des antisynapses est très faible (Figure 32C, barres noires). De façon intéressante, nous avons observé que lorsque la polymérisation des microtubules, dans les cellules T, était bloquée par un traitement au nocodazole, une fréquence importante d'antisynapses pouvait encore être observée, même à des temps très tardifs, jusqu'à 20 minutes après les débuts de

contacts (Figure 32C, barres grises). Ces résultats suggèrent qu'une altération du cytosquelette de microtubules permet une stabilisation des protéines à l'antisynapse.

En conclusion, ces résultats montrent qu'une partie des molécules qui forment les complexes de signalisation antisynaptiques, est transférée à la synapse, et que le passage du pôle antisynaptique au pôle synaptique est médié par une voie dépendante des microtubules.

4. LA DISPARITION DE L'ANTISYNAPSE A LIEU EN MÊME TEMPS QUE LA RELOCALISATION DU MTOC.

Dans des cellules T en migration, le centrosome ou MTOC est habituellement localisé à l'arrière de la cellule. Il est maintenant connu que, rapidement après le contact T-CPA, le MTOC de la cellule T se déplace vers la SI. Étant donné que ces deux événements se produisent dans la même fenêtre de temps, ils ont été suivis ensemble, lors de la formation des conjugués. Le MTOC a été suivi par un marquage de la centrine et l'antisynapse par un marqueur des radeaux lipidiques : mLck (Figure 33A).

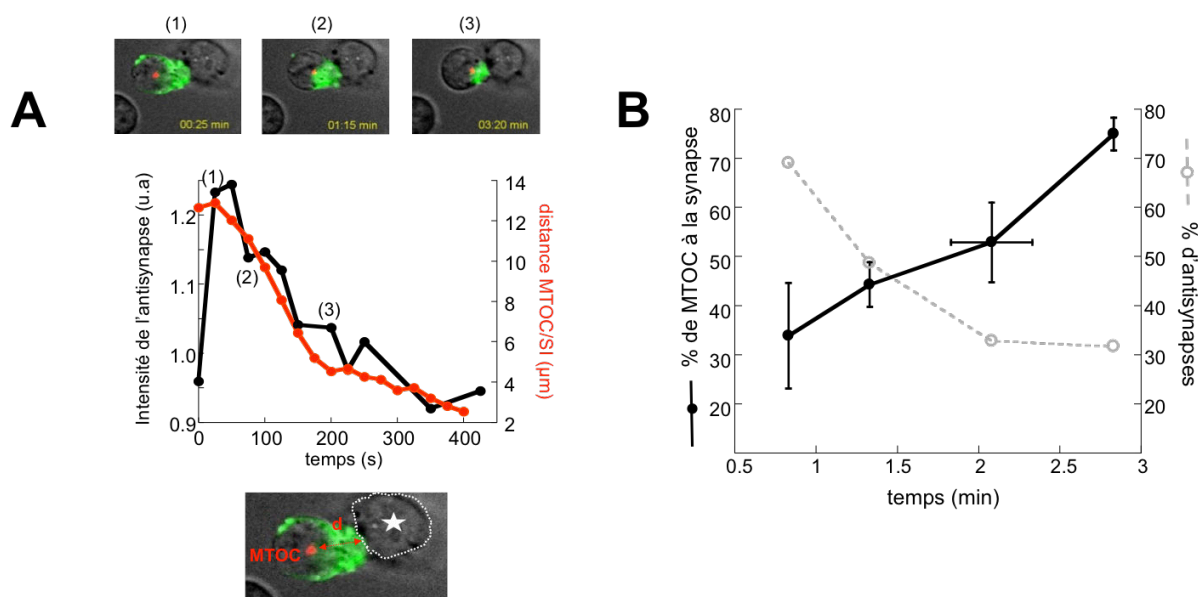


Figure 33: La disparition de l'antisynapse est corrélée avec la relocalisation du MTOC

Le mouvement du MTOC et la cinétique de l'antisynapse ont été observés dans des cellules T Jurkat exprimant la centrine et mLck. (A) Les images du haut représentent le même conjugué cellule T Jurkat/cellule B Raji, 25, 75 et 200 secondes après le contact initial (haut). La distance entre le MTOC et la synapse a été mesurée comme montré dans le schéma sous le graphe et les valeurs en fonction du temps ont été reportées dans le graphe avec l'intensité à l'antisynapse en fonction du temps. L'étoile indique la CPA. (B) Dans la même série d'expériences que celle montrée en Figure 31A, les conjugués ont été synchronisés par centrifugation et la fréquence de conjugués avec un MTOC relocalisé à la synapse a été mesurée à différents temps simultanément avec la fréquence d'observation des antisynapses. Moyennes \pm SE de 3 expériences indépendantes, 8-18 conjugués/condition/expérience.

La relocalisation du MTOC a été quantifiée par la distance entre le MTOC (marqué par la centrine) et la zone de contact (Figure 33A). Il apparaît clairement que le MTOC commence à se déplacer (diminution de la distance MTOC/zone de contact) quand l'antisynapse est totalement formée. Puis après un court délai, l'antisynapse commence à disparaître. Cette observation a été confirmée sur la Figure 33B où, dans la même série de conjugués synchronisés que celle présentée en Figure 31A, la fréquence des antisynapses est inversement corrélée avec celle des conjugués avec un MTOC relocalisé.

Par conséquent, le mouvement du MTOC vers la synapse et la disparition de l'antisynapse sont deux événements reliés temporellement.

5. QU'EST CE QUI CONTRÔLE LA FORMATION DE L'ANTISYNAPSE ?

Un rôle putatif des cytosquelettes de la cellule a d'abord été examiné. Comme montré dans la Figure 32C, un blocage de la dynamique des microtubules ne prévient pas la formation de l'antisynapse. Nous avons aussi cherché à savoir si une dépolymérisation du cytosquelette d'actine avec la latrunculine A, un inhibiteur de la polymérisation de l'actine corticale, pouvait affecter la formation de l'antisynapse. Malheureusement, à 500 nM, c'est à dire la concentration optimale pour laquelle l'inhibiteur est le plus efficace, la formation des conjugués T/CPA est abolie comme cela a précédemment été montré dans une autre étude (Delon et al., 1998b). A des concentrations plus faibles (10 nM), les conjugués se forment normalement et des antisynapses sont observées, cependant, l'effet de l'inhibiteur est modéré (Figure 34). En conséquent, il est impossible d'émettre une conclusion concernant le rôle du réseau d'actine sur la formation de l'antisynapse.

Bien qu'une augmentation du flux calcique ait pu être détectée, dans la plupart des cas, après la formation de l'antisynapse (Figure 31C), on peut imaginer qu'une libération locale de calcium, très faible et indétectable, pourrait être impliquée dans l'induction de la formation de l'antisynapse. Pour aborder cette possibilité, la fréquence des antisynapses a été évaluée dans des conditions où l'élévation de la concentration en calcium a été inhibée par un chélateur du calcium, le BAPTA, après avoir vérifié que celui-ci provoquait bien le blocage de la réponse calcique induite par un anticorps anti CD3 (Figure 35A). Pour trois marqueurs de l'antisynapse (PLC γ , mLck et les tyrosines phosphorylées), aucune différence significative dans l'accumulation anti-synaptique a été observée entre les conditions traitées au BAPTA et les conditions contrôles (Figure 35B).

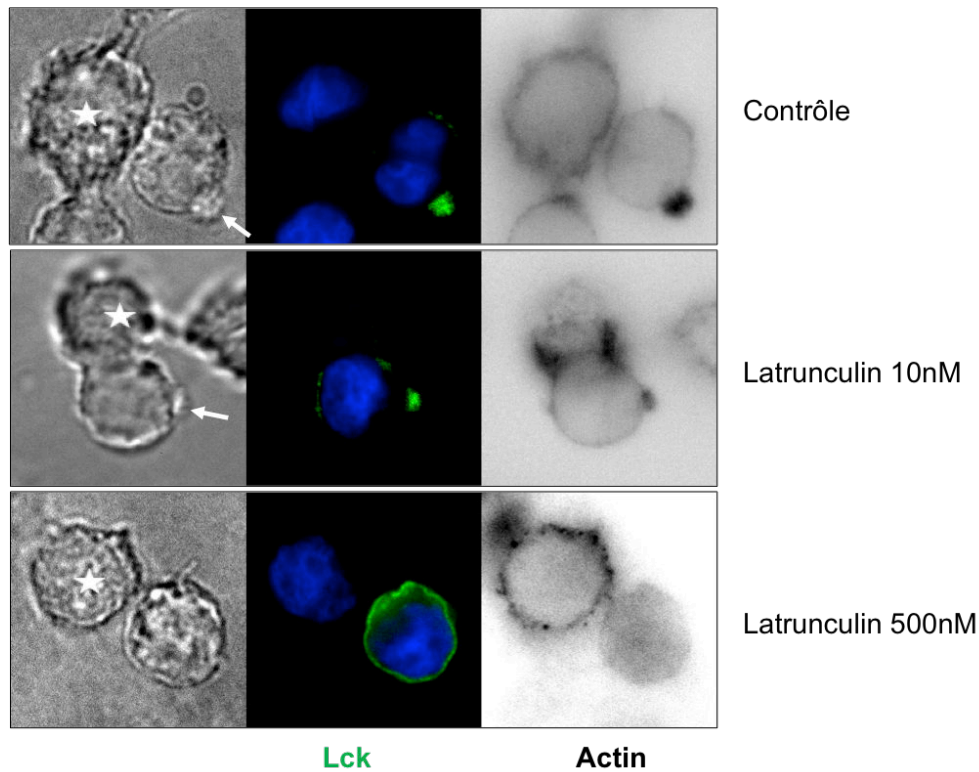


Figure 34: Rôle du cytosquelette d'actine sur la formation de l'antisynapse

Sur des conjugués cellules T Jurkat/cellules B Raji, l'actine se relocalise à l'antisynapse avec Lck (panneau du haut). Un pré-traitement des cellules T avec 10 nM de latrunculine A, n'affecte ni la polymérisation de l'actine, ni la formation des conjugués (panneau du milieu). A 500 nM, le traitement prévient la polymérisation de l'actine mais aussi la formation des conjugués (panneau du bas). Les flèches blanches indiquent les déformations de la membrane associées à la présence d'antisynapses. Les CPA sont indiquées par des étoiles.

L'implication de l'intensité du signal induit par le TCR sur la formation de l'antisynapse a ensuite été étudiée. De façon inattendue, la fréquence des antisynapses reste pratiquement constante quand la concentration en super-antigène (SAg) décroît (Figure 35C). Cette observation est renforcée par l'analyse de conjugués formés entre des CD matures humaines et des LT primaires autologues, en présence ou en absence d'antigènes exogènes. En effet, la fréquence des antisynapses observées en absence d'antigène représente $125 \pm 25\%$ de celle observée en présence de SAg (100 ng/mL) ($n=2$ expériences indépendantes, 35-52 conjugués/condition).

Ces résultats suggèrent que la formation de l'antisynapse pourrait être indépendante de la signalisation du TCR.

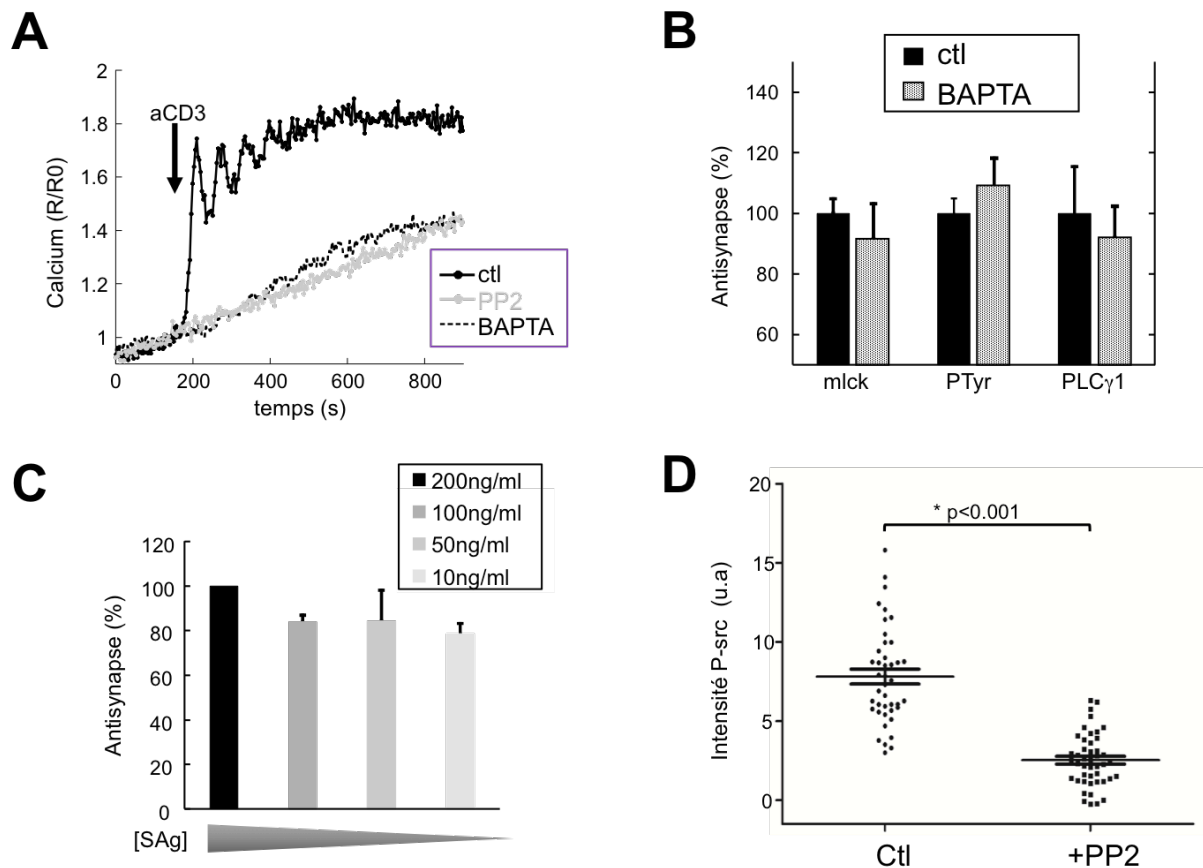


Figure 35: Les voies de signalisation impliquées dans la formation de l'antisynapse

(A) Mesure de la réponse calcique induite par des anticorps anti-CD3 (mesurée par spectro-fluorimétrie) dans des cellules T Jurkat préincubées, quand cela est spécifié, avec 10 μ M de PP2 ou 25 μ M de BAPTA/AM pendant 30 min. (B) La suppression de la réponse calcique dans les cellules T Jurkat traitées avec le BAPTA n'affecte pas la formation des antisynapses (comme le témoigne la localisation des marquages mLck, Phospho-tyrosine ou PLCγ1). (C) La diminution de la concentration en SAg utilisée pour charger les cellules B Raji ne réduit pas la fréquence d'observation des antisynapses dans les conjugués avec des cellules T Jurkat exprimant mLck. Les résultats sont exprimés en pourcentage de la fréquence d'observation des antisynapses obtenue avec 200 ng/mL de SAg. Moyenne \pm SE de 2-5 expériences indépendantes, 29-54 conjugués/condition/expérience. (D) Une pré-incubation des cellules T avec le PP2 réduit l'activation des src kinases comme le montre la diminution de la moyenne d'intensité phospho-src à la SI des conjugués cellules T Jurkat/cellules B Raji (42-45 conjugués/condition).

6. LE DÉCLENCHEMENT DE LA FORMATION DE L'ANTISYNAPSE EST INDÉPENDANT DE LA SIGNALISATION DU TCR.

Pour approfondir cette hypothèse, nous avons examiné le rôle de l'activation de Lck, un des événements les plus précoces survenant après l'activation du TCR. Après l'inhibition de Lck avec un inhibiteur des Src kinases, le PP2, et après avoir vérifié son efficacité en contrôlant le flux calcique et la phosphorylation des tyrosines des src kinases (Figure 35A et D), une fréquence normale d'observation des antisynapses a été observée, comme le témoignent les distributions de LAT et mLck (Figure 36A).

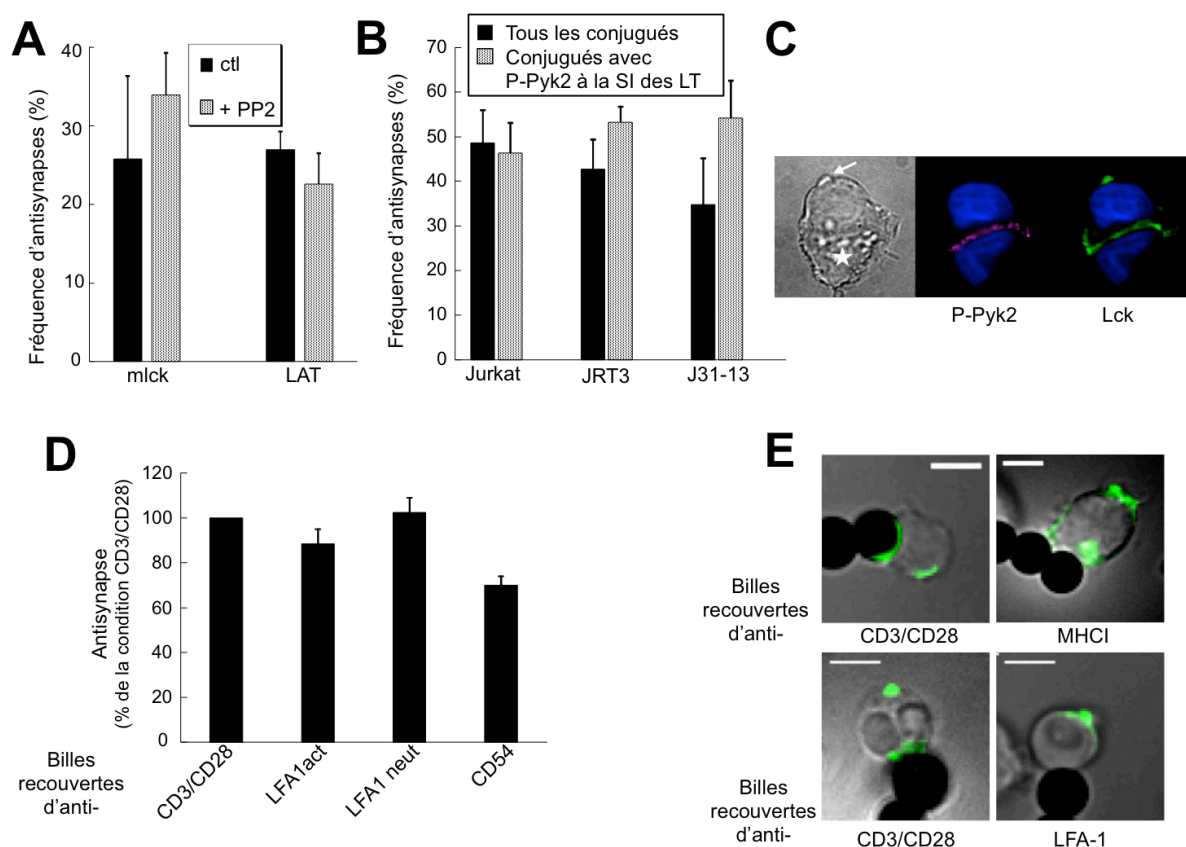


Figure 36: Régulation de la formation de l'antisynapse

(A) Les fréquences d'observation des antisynapses, avec les marqueurs LAT et mLck, ont été calculées dans des cellules T Jurkat exprimant mLck, en contact avec des cellules B Raji pendant 5 min. Quand cela est spécifié, 10 μ M de PP2 ont été ajouté aux cellules T 30 minutes avant le contact. Les cellules T n'ont pas été rincées avant d'être mélangées aux cellules B Raji. (B) Les fréquences d'observation des antisynapses, déterminées par la distribution de Lck, ont été mesurées soit dans la population totale des conjugués cellules T jurkat/cellule B Raji, ou seulement dans celle où Pyk-2 est activé (phosphorylé) à l'interface entre les deux cellules. Les cellules T JRT3 et J31.13 sont des cellules jurkats déficientes en TCR β . (C) Exemple d'un conjugué cellule T Jurkat/cellule B Raji avec une antisynapse et une activation de Pyk2 mise en évidence avec un marquage anti-phospho-Pyk2. L'étoile indique la CPA. (D) Fréquences d'observation des antisynapses avec LAT, déclenchées par un contact de la cellule T Jurkat avec des billes recouvertes d'anticorps dirigés contre CD3/CD28, LFA-1 ou ICAM-1 (CD54). Des anticorps activateurs ou neutralisants contre LFA-1 ont été utilisés. Les résultats ont été normalisés par rapport à la fréquence d'antisynapses obtenue avec les billes recouvertes d'anti CD3/CD28. (E) Exemples de synapses et d'antisynapses observées dans des cellules T Jurkat (panneaux du haut) ou des cellules T primaires (panneaux du bas) en contact avec des billes recouvertes avec les anticorps indiqués. Les antisynapses ont été détectées par un marquage de LAT (vert) pour les cellules T Jurkat et de Lck (vert) pour les cellules T primaires. Les billes apparaissent en noires dans les images en lumière transmise. Moyenne \pm SE de (A) 2-3 expériences indépendantes, 28-79 conjugués/condition/expérience (B) 3-4 expériences indépendantes, 20-50 conjugués/condition/expérience (D) 2-3 expériences indépendantes, 25-61 conjugués/condition/expérience. Barre d'échelle = 5 μ m.

Nous avons ensuite vérifié que la présence du TCR n'était pas essentielle pour le déclenchement de l'antisynapse. Même si l'antisynapse peut être observée en absence d'antigènes exogènes, on ne peut pas exclure que les CMH-II chargés avec des peptides endogènes du soi à la surface d'une CPA, puissent induire des signaux dans les cellules T. Pour écarter cette possibilité, nous avons utilisé des cellules T Jurkat déficientes en TCR (JRT3 (Schneider et al., 1977) et J31.13 (Alcover et al., 1990)) et comparé les fréquences d'observation des antisynapses dans ces différents clones. Les JRT3 et J31.13 sont des cellules T déficientes en chaîne β du TCR. Nous avons préalablement vérifié qu'elles n'exprimaient ni le TCR, ni

le CD3 à leur surface et ne montraient pas de réponse calcique induite par un anti-CD3 contrairement aux cellules Jurkat E6.1 (Figure 37A et Figure 37B).

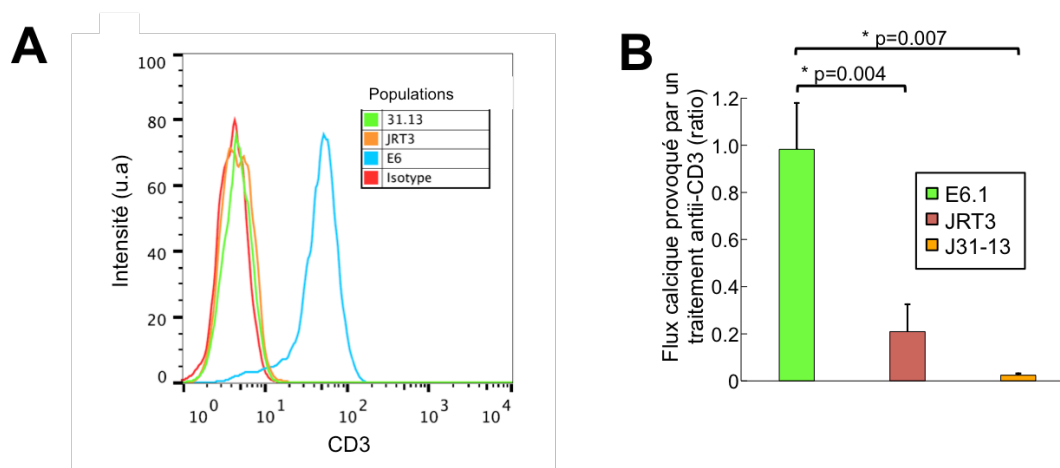


Figure 37: Caractérisation des cellules JRT3 et J31.13

(A) Expressions de CD3 à la surface des clones de cellules T Jurkat E6.1, JRT3 et J31.13 mesurées par cytométrie en flux. **(B)** Réponses calciques induites dans ces différents clones en réponse à un traitement anti-CD3, mesurées par spectro-fluorimétrie. Moyenne de 2-3 expériences.

Comme montrée dans la Figure 36B, à 3 minutes de contact, la fréquence des antisynapses n'est pas réduite de manière significative dans des cellules T déficientes en TCR. Pour s'affranchir du biais que les cellules déficientes en TCR pourraient faire des contacts moins stables avec les CPA, nous avons restreint l'analyse des conjugués à ceux qui faisaient des contacts suffisamment forts pour induire l'activation de Pyk2 à l'interface de contact (Figure 36B et Figure 36C). Pyk2 est une tyrosine kinase activée par l'adhésion, particulièrement dans les cellules T (Doucey et al., 2003). Dans cette population, la fréquence d'observation des antisynapses est légèrement plus haute dans les cellules déficientes en TCR que dans les jurkats E6.1.

Ces résultats confirment que l'activation des voies de signalisation en aval du TCR n'est pas nécessaire pour la formation de l'antisynapse.

7. LA FORMATION DE L'ANTISYNAPSE EST DÉCLENCHÉE PAR L'ADHÉSION

Nous avons ensuite regardé si l'adhésion des cellules T pouvait être suffisante pour déclencher l'antisynapse. Pour cela, nous avons testé la capacité de billes recouvertes d'anticorps à induire des antisynapses après le contact avec des cellules T. Ces billes ont été recouvertes avec des anticorps anti CD3/anti-CD28 comme contrôle ou avec des anticorps dirigés contre les molécules d'adhésion (chaîne α de LFA1 (CD11a) ou ICAM-1 (CD54)). Deux types d'anticorps dirigés contre LFA-1 ont été utilisés, un neutralisant, menant LFA-1 vers son état de basse affinité et un activateur, le menant vers son état de haute-affinité. Toutes les billes recouvertes d'un de ces anticorps sont capables de déclencher la formation d'antisynapses dans des cellules Jurkat ou dans des PBT (cellules T primaires issues du sang périphérique) aussi efficacement qu'avec des billes recouvertes d'anti CD3/CD28 (Figure 36D et Figure 36E

respectivement). De manière intéressante, les billes recouvertes d'anticorps dirigés contre une molécule non impliquée dans la signalisation, le CMH-I par exemple, sont aussi capables d'induire la formation d'antisynapses (Figure 36E).

Ces résultats montrent que l'adhésion et non le signal induit par l'engagement du TCR, est un événement clé dans le déclenchement de l'antisynapse.

II. RÉSULTATS SUR Dlg1 ET LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE

Au début de ma thèse, j'ai eu l'occasion de collaborer avec Cécilia Ramirez et Patrycja Nzounza, dans l'équipe de Claudine Pique à l'institut Cochin. Leur étude a porté sur l'effet de la protéine Dlg1 dans la transmission du virus VIH-1 de cellule-à-cellule. Ma contribution a permis de valider un des modèles utilisé dans leurs expériences : des lymphocytes T dont l'expression de Dlg1 a été inhibée par des siRNA. Je ferai une brève introduction sur le virus VIH-1 et la protéine Dlg1 avant de décrire les résultats obtenus lors de cette collaboration et ce qu'ils ont apporté à cette étude.

1. AVANT PROPOS

Le VIH est un rétrovirus lymphotrope, c'est à dire qu'il peut intégrer son génome dans l'ADN des cellules T. L'infection d'une cellule T peut se faire soit à partir de particules de virus libres ou par un contact avec une cellule infectée, à l'issue duquel une synapse virologique peut se former (voir Encart n° 2).

L'entrée du virus dans la cellule se fait grâce à la glycoprotéine virale gp120. Celle-ci provoque un rapprochement de CD4 avec le récepteur aux chimiokines CCR5 à la surface de la cellule cible. Des études ont montré que gp120 pouvait activer de nombreuses protéines et voies dans la cellule T : voie des MAP kinases, voie calcique, activation des protéines d'adhésions FAK et Pyk2 et la translocation de NFAT dans le noyau (Cicala et al., 1999)(Davis et al., 1997)(Lee et al., 2005a)(Melar et al., 2007)(Cicala et al., 2006).

Dlg1 (*Drosophila Discs Large*) appartient à la famille des protéines MAGUK (*membrane associated guanylate kinase*) qui sont caractérisées par la présence d'un à trois domaines PDZ, un domaine SH3 et un domaine guanylate kinase sans activité enzymatique. Cette protéine est exprimée dans la plupart des tissus ainsi que dans les cellules T humaines et murines (Xavier et al., 2004)(Round et al., 2005).

Dans les cellules T, Dlg1 interagit avec Kv1.3 (canal potassique) CD2 et Lck (Hanada et al., 1997). Il intervient également dans le processus d'*inside-out* de LFA-1 en interagissant indirectement avec lui (Ralston et al., 2004). Il est aussi impliqué dans la polarité en intervenant sur la morphologie, la migration et la formation des SI. Il a d'ailleurs été localisé à l'uropode, au niveau de la synapse immunologique et au pôle distal (Cullinan et al., 2002)(Ludford-Menting et al., 2005)(Xavier et al., 2004). Lors de la formation d'un contact, il se localise d'abord à la synapse immunologique dans les cinq premières minutes de contact puis à l'opposée 15 à 25 min plus tard dans des cellules Jurkat. Il se relocalise au niveau du cytosquelette d'actine et représente un frein à l'activation puisqu'une extinction de Dlg1 par une approche de siRNA entraîne une augmentation de l'activation de NFAT (Xavier et al., 2004). Dans des cellules CD8⁺ murines, la cinétique et la régulation de Dlg1 est bien différente. Il n'est pas présent à la synapse dans les cinq premières minutes mais s'y relocalise 20 à 25 min plus tard. Il se concentre principalement dans les radeaux lipidiques où il forme un complexe avec Lck, ZAP-70 et WASp (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*). Ce complexe est impliqué dans la polymérisation de l'actine, l'agrégation des TCR dans les radeaux lipidiques, l'activation de NFAT, la production de cytokine et l'activité cytotoxique. Contrairement à l'étude précédente, Dlg1 est décrit comme un régulateur positif pour l'activité effectrice des cellules T

CD8⁺ (Round et al., 2005). Il interagit également avec l'eitrine et intervient au niveau de l'architecture de la synapse immunologique (Lasserre et al., 2010).

Dlg1 a récemment été identifié comme un nouveau partenaire de la protéine virale Gag du VIH-1 et décrit comme un régulateur négatif de l'infection. Dans des cellules T déficientes en Dlg1, la production de Gag, la maturation et la libération des virus ne sont pas affectées mais les virions sont cinq fois plus infectieux en raison d'une augmentation de l'expression de la protéine Env à leur surface (Perugi et al., 2009).

Dlg1 qui joue un rôle à la fois à la synapse immunologique et dans le contrôle de l'infection par le VIH-1, n'avait jamais été étudié pour ses effets dans la transmission des virus de cellule-à-cellule lors de la formation d'une structure proche de la synapse immunologique, la synapse virologique.

Basées sur ces observations, Cécilia Ramirez et Patrycja Nzounza se sont proposées d'étudier l'implication de Dlg1 dans l'infection des cellules T de cellule-à-cellule par le VIH-1 dans Nzounza et al., 2012. Ma contribution a permis de valider un des modèles utilisés dans cette étude : des lymphocytes T dont l'expression de Dlg1 a été inhibée par des siRNA. J'ai, pour cela, vérifié que dans ces cellules, une des étapes précoces qui survenait lors de la formation de la SI, la relocalisation du MTOC, était bien altérée comme montrée précédemment dans la littérature (Lasserre et al., 2010).

2. DLG1 EST IMPLIQUÉ DANS LA RELOCALISATION DU MTOC DANS LES CELLULES T

Les cellules T Dlg1⁻ ont été caractérisées fonctionnellement par l'observation de la polarisation du MTOC lors de la formation de SI entre des cellules T et des CPA. Dans les cellules T, la polarisation du MTOC à la membrane plasmique survient dans les premières minutes après la formation d'un contact.

L'accumulation de phospho-tyrosines à la zone de contact entre les conjugués a été utilisée comme marqueur des contacts productifs. La centrine a permis de visualiser le MTOC. La Figure 38 montre les résultats obtenus avec les cellules transfectées avec les vecteurs pHIV H1shRNADlg1 (Dlg1⁻) et pHIV-H1shRNActl (Dlg1⁺) exprimant aussi la GFP. Comme attendu, la polarisation du MTOC sous la membrane synaptique lors de la formation des contacts est réduite dans les cellules Dlg1⁻. Des exemples de cas où le MTOC est polarisé dans un conjugué avec une cellule Dlg1⁺, et un autre où il ne l'est pas avec une cellule Dlg1⁻, sont montrés dans la Figure 38 à gauche. La quantification de la fréquence de relocalisation du MTOC est fortement réduite dans les cellules Dlg1⁻ par rapport aux cellules Dlg1⁺.

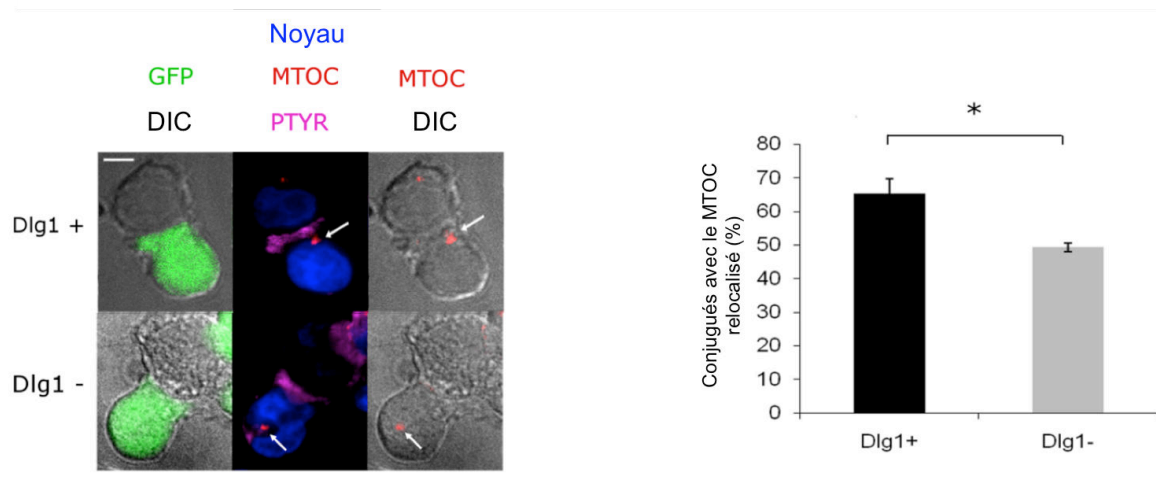


Figure 38: Une inhibition de l'expression de Dlg1 affecte la relocalisation du MTOC.

Les conjugués ont été formés avec des cellules T Jurkat/cellules B Raji. L'accumulation de phospho-tyrosines à l'interface entre les deux cellules sert de témoin pour les contacts productifs. La centrine couplée à la GFP est utilisée pour suivre le MTOC. Panneau de gauche : un cas où le MTOC est polarisé dans une cellule T Dlg1+ (haut) et un autre où il ne l'est pas dans une cellule Dlg1- (bas) lors de contact avec une CPA. Les cellules T ont été transfectées avec les vecteurs : pHIV-H1shRNADlg1 ou pHIV-H1shRNACtl. Le noyau est en bleu, le MTOC est en rouge et indiqué par une flèche blanche. Le marquage phospho-tyrosine est en magenta. Panneau de droite : Quantification de la fréquence de relocalisation du MTOC observée dans des cellules Dlg1+ (n=131) et Dlg1- (n=151) de 4 expériences indépendantes. $P=0,029$.

3. CONCLUSION

Nos résultats ont ici permis de valider le fait que des cellules T Jurkat, Dlg1-, avaient bien un défaut de relocalisation du MTOC comme cela avait déjà été rapporté dans la littérature. Une fois ce modèle caractérisé, Cécilia Ramirez et Patrycja Nzounza ont pu l'utiliser afin d'étudier le rôle de Dlg1 dans la formation de la synapse virologique et de la transmission des virus, de cellule à cellule.

Les auteurs de cette étude ont démontré pour la première fois, que bien que de Dlg1 ait un rôle dans la formation de la synapse immunologique et dans la signalisation des cellules T, celui-ci n'affectait ni la formation et la structure des synapses virologiques, ni la propagation du VIH-1 de cellule-à-cellule. Le mode de régulation négatif de Dlg1 serait en fait lié à ses effets sur la composition en cholestérol des enveloppes de virions, qui affecterait les étapes de fusion de l'enveloppe à la surface des cellules lors de l'infection.

DISCUSSION

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser une nouvelle structure, l'antisynapse, qui constitue un nouveau maillon lors de l'activation des lymphocytes T. Après être revenue sur les caractéristiques surprenantes de l'antisynapse et avoir replacées celles-ci dans le contexte de la littérature, je discuterai nos données concernant la régulation de cette structure. Enfin, je chercherai à comprendre comment et pourquoi l'antisynapse permet d'optimiser l'activation lymphocytaire.

1. L'ANTISYNAPSE, UNE PRÉ-SYNAPSE À L'OPPOSÉ DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE.

Notre étude a permis de mettre au jour une nouvelle structure qui apparaît dans les lymphocytes T, au pôle opposé de la zone de contact avec une CPA. Cette structure se forme très précocement, environ 1 minute après le contact, avant la synapse immunologique et peut durer jusqu'à 5 minutes en moyenne.

Sa composition est plutôt inattendue puisqu'on retrouve à ce pôle une accumulation de protéines normalement impliquées dans la signalisation au niveau de la synapse immunologique comme Lck, LAT et la PLC γ . Des relocalisations paradoxales similaires peuvent souvent être observées dans la littérature, dans des images de conjugués, prises à des temps précoces (Figure 39A-F).

Dans la plupart de ces études, les auteurs ne commentent pas ce phénomène qui a pourtant de quoi surprendre.

Une étude en 2009 de l'équipe de C. Wülfing et N. S. C. Van Oers, fait cependant exception. Dans celle-ci, les auteurs ont passé au crible, les caractères spatio-temporels d'une trentaine de protéines dans les cellules T. Ils ont relevé pendant les quinze premières minutes de contact, les positions de chacune de ces protéines. Les positions ont été classées en sept catégories dont une « distale » qui correspond à la position de l'antisynapse. Cette étude va dans le même sens que nos données puisque le TCR, la chaîne CD3 ϵ , la PLC γ , ZAP-70 et la production de PIP $_3$ ont été détectés au pôle distal entre 0 et 2 minutes après le contact dans 20 à 60% des conjugués selon les marqueurs (Figure 39G) (Singleton et al., 2009). Cette étude est cependant très descriptive et n'identifie pas l'antisynapse comme une nouvelle structure pouvant jouer un rôle dans l'activation lymphocytaire.

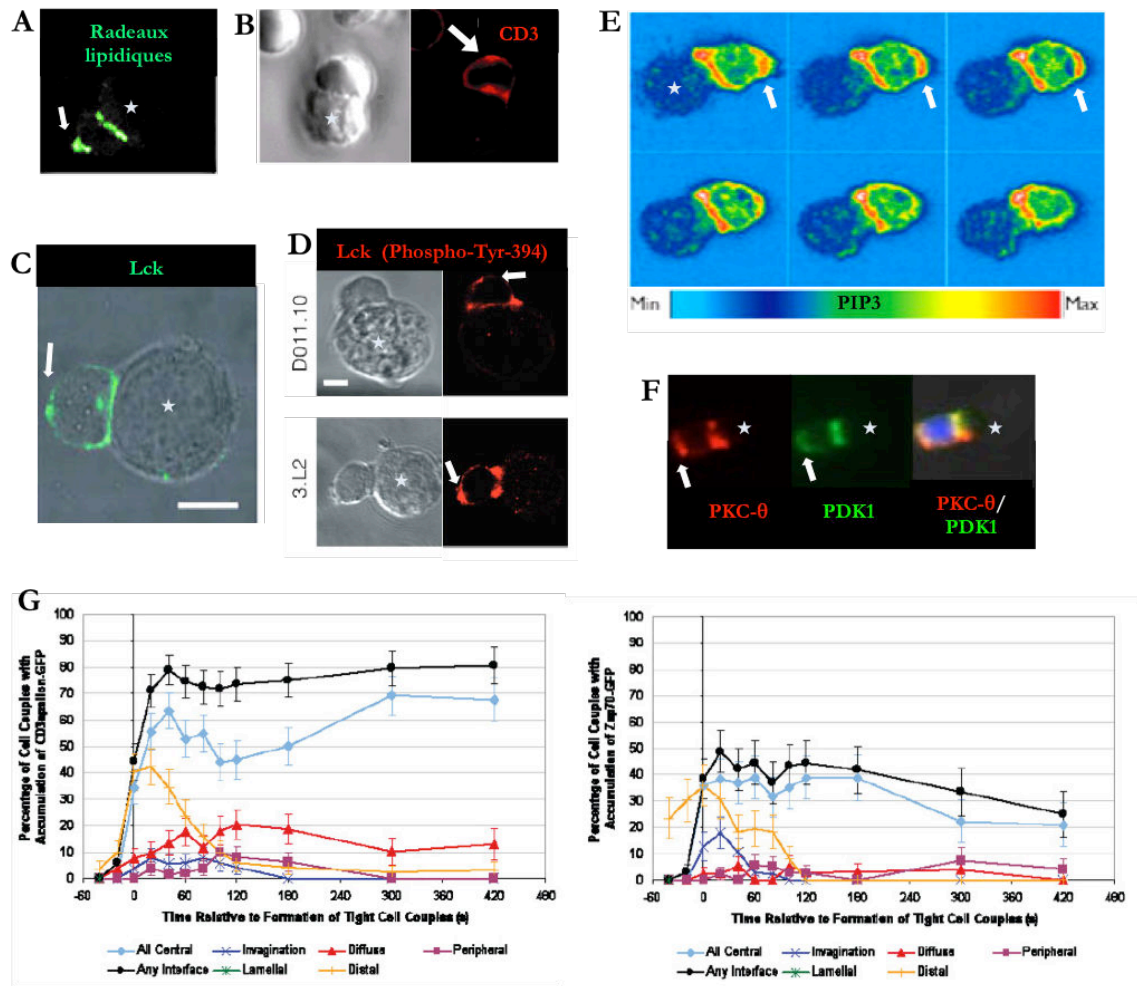


Figure 39: Exemples d'antisynapses relevés dans la littérature.

(A) LT murin AD10 spécifique du cytochrome C – LB CH27 chargée avec le cytochrome C (Bi et al., 2001). (B) LT CD4⁺ ou CD8⁺ primaires – CD primaire murine (Revy et al., 2001). (C) Jurkat - Raji chargée en SAg SEE (Tavano et al., 2006). (D) LT D011.10-LB TA3 (Holdorf et al., 2002). (E) LT murin P14 - LB splénique chargé en antigène spécifique (Costello et al., 2002). (F) LT CD4⁺ primaire murin - bille recouverte d'anti CD3/CD28 (Park et al., 2009b). (G) Relocalisations spatio-temporelles du mouvement de CD3ε (à gauche) et ZAP-70 (à droite) dans des cellules T murines 5C.C7 avec des LB CH27. La courbe jaune correspond à la position distale et la bleue claire à la position synaptique (Singleton et al., 2009).

Des structures de localisation similaire à celle de l'ASI ont été observées : le DPC et le cap. Cependant, l'antisynapse ne partage aucune des caractéristiques préalablement identifiées pour ces structures. Le DPC, et le *cap* n'ont été observés qu'à des temps tardifs, postérieurs à la disparition de l'antisynapse (Cullinan et al., 2002)(Barr et al., 2009). Le DPC, qui n'a été observé que dans des cellules murines, se compose d'une molécule inhibitrice, CD43 alors que l'antisynapse se compose de protéines activatrices (Cullinan et al., 2002). Cette structure, se distingue également de l'eupode puisqu'elle ne peut être observée qu'au moment du contact et non avant, lors de la phase de migration.

D'un point de vue morphologique, il est fréquent d'observer un petit bourgeon, à l'antisynapse, qui rappelle celui qui a été observé dans des cellules endothéliales en cours de polarisation basale/apicale. Une

étude a montré que lorsque ces cellules s'étalent sur un support, un bourgeon apparaît au pôle opposé à la zone d'adhésion (pôle apical). Celui-ci est riche en actine, en moésine activée ainsi que des src kinases activées également (Galvagni et al., 2012). L'actine et la src kinase Lck ont-elles aussi été retrouvées à l'antisynapse. Comme abordée dans les paragraphes suivants, la caractérisation de cette structure, au niveau morphologique, pourrait nous aider, sur de nombreux points, à mieux comprendre les mécanismes qui régulent la formation de l'antisynapse dans les cellules T.

2. RÉGULATION DE CETTE STRUCTURE

Nous avons émis deux hypothèses pour expliquer la formation d'une telle structure. L'engagement de quelques molécules de TCR au niveau de la synapse pourrait provoquer une cascade de signalisation suffisamment forte pour induire le recrutement de protéines à l'opposé. Les signaux d'adhésion déjà connus pour leur rôle dans la formation de la synapse et l'activation pourraient aussi être suffisants, en absence de signal TCR, pour le déclenchement de ce phénomène.

Nous avons montré que la formation de l'antisynapse pouvait être totalement indépendante du signal du TCR, mais dépendante d'un signal d'adhésion. En effet, le blocage des Src kinases, qui se situent très en amont de la signalisation par le TCR, n'empêche pas l'observation d'antisynapses. La présence du TCR n'est d'ailleurs pas essentielle pour l'observation de ce phénomène car des cellules déficientes en TCR sont toujours capables de former des antisynapses. De façon surprenante, nous avons montré que les cellules T peuvent former des synapses grâce à un simple signal d'adhésion sur une bille. Quel que soit le type d'anticorps qui recouvre la bille, si la protéine ciblée est présente à la surface du LT, cela suffit à déclencher la formation d'antisynapses. Cela suggère que sa formation n'est pas dépendante d'un récepteur spécifique. Un mode de régulation par l'adhésion, a aussi été observé pour le recrutement des protéines au bourgeon apical, qui se forme dans de nombreux types cellulaires comme les cellules endothéliales ou les fibroblastes (Galvagni et al., 2012).

1. COMMENT UN SIGNAL D'ADHÉSION À LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE PEUT-IL PROVOQUER UN RECRUTEMENT DE PROTÉINES À L'OPPOSÉ DE LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE ?

Déclenchement d'une cascade de signalisation

Dans les cellules T, une des possibilités serait qu'une cascade de signalisation se mette en place très rapidement en aval du signal d'adhésion à la zone de contact, pour induire le recrutement de protéines de signalisation à l'antisynapse.

Des messagers secondaires pourraient alors être impliqués dans ces voies.

Le Ca^{2+} , qui a la possibilité de diffuser très rapidement dans le cytosol, pourrait être un bon candidat. Nos résultats montrent que l'antisynapse apparaît dans la même fenêtre de temps que le signal calcique. De plus, des études ont déjà montré qu'une élévation du calcium pouvait avoir lieu en réponse à un signal d'adhésion, médié par LFA-1 (Kanner et al., 1993)(Dixit et al., 2011). Nos observations d'antisynapses en présence de chélateurs calciques, montrent cependant que cette hypothèse n'est pas la bonne.

En 2009, Clotilde Randriamampita et Claire Conche ont montré au laboratoire qu'un signal d'adhésion pouvait générer un signal d'AMPc transitoire au niveau de la synapse immunologique (Conche et al., 2009). La localisation subcellulaire de ce messager secondaire, en réponse à ce signal, mériterait d'être identifiée pour répondre à cette question. Pour tester le rôle de l'AMPc dans le recrutement des protéines à l'antisynapse, il serait intéressant d'observer le mouvement de plusieurs marqueurs suite à la libération locale d'AMPc encagé grâce à un flash.

Une autre possibilité serait que le signal d'adhésion entraîne la production de phosphoinositides, comme le PIP₂ et le PIP₃, à l'arrière de la zone de contact. Ces lipides membranaires sont connus pour leur capacité à contrôler la localisation subcellulaire des protéines porteuses de domaines particuliers. Cette hypothèse est renforcée par plusieurs études. Une production de PIP₂ par la kinase PIP5K a été détectée à l'antisynapse. Les différents isoformes de la PIP5K exercent leurs activités à différentes localisations. Les PIP5K β et γ sont dites distales car elles sont toutes deux retrouvées à l'antisynapse dans les premières minutes du contact (Sun et al., 2011). Cette hypothèse laisse certes ouverte la question du déclenchement de l'activité de la PIP5K. En tout cas, si elle était correcte, un enrichissement local en PIP₂ pourrait permettre le recrutement de différentes protéines. Par exemple, la chaîne CD3 ϵ pourrait ainsi être recrutée à l'antisynapse grâce au PIP₂ puisqu'elle possède un domaine de liaison à ce phosphoinositide (DeFord-Watts et al., 2011). Il est intéressant de noter que la protéine PDK1, qui a déjà montré un rôle pour l'activation de la PKC- θ (Lee et al., 2005b), possède un domaine de liaison au PIP₂, et a déjà été rapportée pour être recrutée à l'antisynapse (Park et al., 2009b).

Le PIP₂ est à l'origine de la formation d'un autre phosphoinositide : le PIP₃. Une étude a montré que celui-ci est produit d'une manière bipolaire dans des cellules T en réponse à des signaux TCR, de co-stimulation et d'adhésion. La PI3K, qui produit le PIP₃ à partir de PIP₂, peut de façon surprenante avoir une activité à la fois à la synapse immunologique mais aussi à l'antisynapse. Ces résultats ont permis de mettre en lumière le fait que la synapse immunologique n'est pas le seul site où la transduction du signal peut exercer ses effets (Costello et al., 2002).

Un autre argument pour relier le signal d'adhésion avec l'antisynapse pourrait venir d'une protéine de la famille des FAK (*Focal adhesion kinase*), Pyk2. Cette dernière se retrouve recrutée aux points d'adhésion avec la CPA et activée (Doucey et al., 2003). L'implication de Pyk2 dans la formation de l'antisynapse est actuellement en cours d'étude au laboratoire par Nicolas Abraham, étudiant en thèse. Il a utilisé des cellules T déficientes en TCR et qui ne peuvent par conséquent répondre qu'à des signaux d'adhésion. Ses résultats montrent que les LT qui présentent une activation de Pyk2 au niveau de la synapse, sont plus susceptibles de former une antisynapse. D'autres travaux plus préliminaires montrent qu'une inhibition de Pyk2 entraîne une réduction du pourcentage d'observation des antisynapses de près de la moitié dans des conditions où il n'y a pas de signal du TCR. Ces résultats encourageants seront approfondis dans un futur proche.

Application d'un stress mécanique induit par la CPA

Parmi les événements les plus précoces qui surviennent après l'établissement d'un contact, on pourrait aussi envisager qu'un signal mécanique, apporté par la CPA au niveau de la synapse, conduise au

recrutement des protéines à l'antisynapse. La tension membranaire à l'avant serait alors initiatrice de la propagation d'un signal de l'autre côté de la cellule.

Cette hypothèse est soutenue par des expériences où nous avons utilisé, en tant que substitut de CPA, des billes et des lamelles en verre recouvertes d'anticorps contre des molécules de surface des LT. En présence de billes, la formation d'antisynapses est assez systématique alors que sur des surfaces, elle est plus rare. Cela est probablement dû au fait que les forces fournies par la cellule T pour optimiser sa surface de contact sont plus importantes en présence de billes qu'avec des surfaces planes. En effet, nos images montrent que les LT « enrobent » la bille comme ils le font avec les CPA alors que sur une surface plane, ils s'étalent légèrement.

Les forces mécaniques qui s'exercent au niveau de la zone de contact ont déjà été caractérisées. Grâce à des expériences de microscopie à force atomique, une étude a montré que suite à un stress mécanique au niveau de la synapse immunologique, un relâchement membranaire à la zone de contact, dû à une dépolymérisation du cytosquelette d'actine et de microtubules, ainsi qu'un changement dans la composition membranaire sont détectés (Verstraeten et al., 2010). Les forces exercées sont proportionnelles à l'affinité du peptide présenté par la CPA. Les valeurs moyennes de ces forces peuvent quadrupler à partir du moment où les deux cellules se touchent jusqu'à trois minutes après l'établissement du contact (Lim et al., 2011).

Comment un signal mécanique à l'avant peut-il provoquer un événement à l'arrière ? Un mécanisme a déjà été identifié dans des neutrophiles au cours de leur migration. La tension exercée au niveau du *leading edge*, grâce à l'attachement des pseudopodes à leur support, provoque l'inhibition de la formation d'un autre *leading edge* aux autres pôles de la cellule. Ce contrôle initié par une déformation de la membrane est essentiel pour la génération d'un unique pôle explorateur qui dirige le mouvement (Houk et al., 2012). Cela suggère que les variations physiques de la membrane, qui surviennent au niveau d'une zone de contact, ont la possibilité d'initier un signal de l'autre côté de la cellule.

Idéalement, pour vérifier cette hypothèse, il faudrait contraindre un LT à établir un contact sur une CPA ou sur une bille immobilisée, en exerçant des forces plus ou moins importantes et observer le recrutement des protéines à l'antisynapse. L'usage de pinces optiques se révèle cependant difficile dans cette étude. Le problème réside dans le fait que la micropipette utilisée pour déplacer la cellule T exercerait une succion à l'endroit même où l'antisynapse est attendue. La tension membranaire exercée par cette micropipette biaiserait alors nos observations.

2. PAR QUELLES VOIES LES PROTÉINES ATTEIGNENT L'ANTISYNAPSE ?

Les protéines qui s'accumulent à l'antisynapse pourraient provenir soit du pool membranaire et/ou du pool vésiculaire intracellulaire. Pour étudier la voie membranaire, il serait intéressant de perturber la composition des radeaux lipidiques dans la membrane, qui correspondent au lieu de regroupement privilégié de protéines retrouvées à l'antisynapse comme Lck et LAT. On peut faire l'hypothèse que si les protéines ancrées dans les radeaux lipidiques diffusent dans la membrane pour atteindre l'antisynapse, une altération de leur composition provoquerait une réduction de l'observation des antisynapses. En ce qui

concerne la voie intracellulaire, nous pourrions bloquer les voies du trafic vésiculaire à plusieurs niveaux (l'adressage, l'ancrage ou la fusion des vésicules à la membrane) et observer l'intensité du recrutement des protéines à l'antisynapse.

Étant donné que les protéines sont recrutées très rapidement à l'antisynapse, la diffusion des protéines doit se faire selon un processus actif. On peut faire l'hypothèse que le cytosquelette de filaments d'actine ou de microtubules dynamise ce mouvement.

Nos données montrent que le cytosquelette de microtubules n'est pas important pour le mouvement des protéines vers l'antisynapse, puisque une inhibition de la polymérisation des microtubules n'empêche pas la formation de l'antisynapse. Nos données ne nous ont malheureusement pas permis de conclure à l'intervention du cytosquelette d'actine puisque une inhibition optimale de sa polymérisation entraîne également un défaut de contact entre les LT avec les CPA. De façon intéressante, dans l'étude sur les bourgeons apicaux, les auteurs ont montré que le cytosquelette d'actine ainsi qu'un de ses partenaires, la moesine, étaient essentiels pour la formation de cette structure (Galvagni et al., 2012).

3. QUELS SONT LES SIGNAUX QUI ENTRAÎNENT LA DISPARITION DE L'ANTISYNAPSE ?

Le signal TCR qui survient à la zone de contact pourrait induire la disparition de l'antisynapse. Nous avons montré que l'inhibition des Src kinases, qui se situent les plus en amont de la signalisation par le TCR, entraîne en effet une légère augmentation du pourcentage d'observation des antisynapses. Réciproquement, cette hypothèse signifie qu'en absence d'un signal fort à la zone de contact, l'antisynapse mettrait plus de temps à s'estomper. DeFord-Watts et al., 2009 ont montré qu'une mutation dans les tyrosines des motifs ITAM de la chaîne CD3 ϵ , qui les rend insensibles aux phosphorylations suite à l'engagement du TCR, menait à un délai de disparition de l'antisynapse et d'apparition de la synapse immunologique plus long. Une autre étude a montré que suite à l'engagement du TCR et à l'activation de la PKC, la β -arrestine 1 phosphorylée pouvait se fixer au TCR, dont les motifs ITAM n'étaient pas phosphorylés, situés à l'extérieur de la zone de contact entraînant ainsi leur endocytose. Ces résultats suggèrent que le signal TCR à la zone de contact pourrait être impliqué dans la clairance des TCR à l'antisynapse (Fernández-Arenas et al., 2014).

Pour approfondir l'hypothèse du signal TCR comme déclencheur de la disparition de l'antisynapse, il serait intéressant d'observer par vidéo-microscopie la dynamique des marqueurs de l'antisynapse, lors des contacts en présence de cellules chargées avec des antigènes de diverses affinités.

4. QUEL EST LE DESTIN DES PROTÉINES QUI QUITTENT L'ANTISYNAPSE ?

Nos données cinétiques ainsi que celles de Singleton et al., 2009, montrent que les protéines s'accumulent à l'antisynapse avant la formation de la synapse. De plus, la disparition de cette structure ne survient qu'au pic d'intensité de la synapse immunologique. À la vue de ces résultats, il était alors tentant d'imaginer que l'enrichissement des protéines à la synapse immunologique était une conséquence de leur appauvrissement à l'antisynapse. Nous avons en effet montré, grâce aux expériences de photo-conversion qu'une partie des protéines qui forment la synapse immunologique proviennent de l'antisynapse.

L'étude sur la β -arrestine 1, citée dans le paragraphe précédent, va dans le sens même sens. Sa liaison aux motifs ITAM des TCR non engagés, entraîne leur recyclage vers la synapse immunologique. Ces résultats suggèrent que les TCR sont dirigés vers la synapse immunologique une fois retirés de l'antisynapse (Fernández-Arenas et al., 2014).

5. PAR QUELLES VOIES LES PROTÉINES VONT DE L'ANTISYNAPSE À LA SYNAPSE ?

La clairance des protéines à l'antisynapse nécessite un cytosquelette de microtubules intact puisque une altération de son intégrité entraîne la stabilisation des protéines à ce pôle. Comment les protéines peuvent se déplacer de l'antisynapse à la synapse en utilisant les microtubules ? Comme pour leur arrivée à l'antisynapse, deux chemins sont possibles : soit par la membrane ou par les voies du trafic intracellulaire.

Une étude récente a montré que les microclusters de protéines, au sein de la synapse, peuvent se déplacer à l'aide de moteurs moléculaires, en utilisant les microtubules comme des routes, tout en restant ancrés dans la membrane (Hashimoto-Tane et al., 2011). En utilisant la méthode de microcopie de haute résolution PALM, il serait intéressant de suivre par vidéo-microscopie, le trajet parcouru des protéines individuelles à partir de l'antisynapse et en même temps que la localisation des microtubules et la membrane. Une autre approche consisterait en l'inhibition de l'activité motrice de la dynéine pour vérifier que les protéines restent immobilisées à l'antisynapse faute de pouvoir voyager sur les microtubules.

Il n'est pas non plus à exclure que les protéines utilisent une des voies intracellulaires pour passer de l'antisynapse à la synapse. Fernández-Arenas et al., 2014 ont d'ailleurs montré que les TCR non engagés pouvaient être endocytés, rapidement après le contact, à partir de zones membranaires situées ailleurs qu'à la zone de contact et libérés au niveau de la synapse immunologique.

Pour approfondir cette hypothèse, il faudrait alors bloquer les différentes voies de recyclage qui ont déjà été identifiées dans les cellules T à condition que celles-ci ne soient pas impliquées dans la formation de l'antisynapse.

3. AVANTAGES CONFÉRÉS PAR L'ANTISYNAPSE AUX CELLULES T

L'antisynapse qui s'observe dans plus de 60% des conjugués productifs pourrait conférer des avantages à la cellule T. Étant donné qu'il n'est guère possible d'empêcher sa formation ou de la stabiliser sans affecter d'autres fonctions cellulaires, il est difficile d'établir avec certitude une implication directe pour cette structure. J'évoquerai trois possibilités ci-dessous.

1. CONTRIBUTION AU MOUVEMENT DU MTOC

Nous avons montré que l'antisynapse apparaissait dans la même fenêtre de temps qu'un autre événement précoce qui survient dans les cellules T, la relocalisation du MTOC.

Le MTOC qui se trouve à l'uropode des cellules T lors de la migration, est donc à l'arrière au début du contact entre une cellule T et une CPA. Son repositionnement survient en deux phases, une phase de mouvement rapide où le MTOC se rapproche de la synapse immunologique, puis lente où il est amarré

juste sous la membrane synaptique (Yi et al., 2013). Comme je l'ai présenté dans l'introduction, son mouvement est dépendant de deux moteurs : la dynéine et la myosine. La dynéine se relocalise au niveau de la synapse immunologique et tire le MTOC vers elle en glissant le long des microtubules alors que la myosine se trouve à l'arrière et semble exercer une pression sur lui (Liu et al., 2013). Le mécanisme par lequel le MTOC passe de l'arrière à l'avant, en étant à la fois poussé à l'arrière et tiré à l'avant dépend de l'ancrage des extrémités des microtubules dans la membrane au niveau de la synapse immunologique (Yi et al., 2013).

On peut se demander si un ancrage des microtubules au pôle opposé ne serait pas aussi nécessaire pour stabiliser le mouvement du MTOC vers l'avant. Dans une revue, M. Huse a émis l'hypothèse que les forces générées par la myosine à l'arrière, se propageraient via les extrémités des microtubules ancrés dans les clusters de myosine (Huse et al., 2013). Ce mécanisme impliquerait alors une étroite collaboration entre le cytosquelette d'actine et de microtubules à ce pôle. Nos données montrent que l'actine est bien présente au niveau de l'antisynapse. Pour visualiser les extrémités des microtubules, il serait intéressant de regarder la présence des protéines stabilisatrices des extrémités « plus » des microtubules (+*Tip*s), comme APC et EB-1, dans des lymphocytes T qui présentent une antisynapse. Il faudrait aussi regarder la présence de microtubules acétylés à ce pôle. L'ancrage de microtubules acétylés dans les bourgeons apicaux a été rapporté (Galvagni et al., 2012). Cette modification post-traductionnelle sur la tubuline favorise la stabilisation des filaments.

L'ancrage bipolaire des microtubules est un phénomène qui se produit à l'occasion de la formation du fuseau mitotique dans des cellules en division. A partir du centrosome émanent des microtubules qui prennent deux directions différentes, les polaires dont les extrémités vont s'ancrer aux kinétochores des chromosomes et les astraux dont les extrémités vont s'ancrer indirectement à la membrane plasmique. L'ancrage des microtubules des deux côtés de la cellule permet une ségrégation optimale des chromosomes. Dans ce contexte, l'ancrage des microtubules à la membrane, est dépendant de l'activité de la PI3K et de la production de PIP₃ (Toyoshima et al., 2007).

En conclusion, l'antisynapse pourrait constituer une plateforme, utile à la relocalisation du MTOC. Le PIP₃ produit à l'antisynapse (Costello et al., 2002) pourrait alors représenter un bon candidat dans l'ancrage des microtubules à ce pôle.

2. L'ASSEMBLAGE D'UN PRÉ-SIGNALOSOME DESTINÉ À LA SYNAPSE IMMUNOLOGIQUE

Comme nos expériences de photo-conversion l'ont montré, les protéines recrutées à l'antisynapse approvisionnent la synapse immunologique lors de sa formation. A l'antisynapse, les composants antisynaptiques, pourraient s'assembler entre eux pour former un complexe, un pré-signalosome. L'apport de pré-signalosomes à la synapse pourrait ainsi permettre une mise en place optimale de la synapse immunologique et favoriser l'activation des cellules T.

Dans ce chapitre, j'exposerai d'abord les arguments en faveur de l'existence d'un pré-signalosome puis je présenterai quelques études qui pourraient nous aider à faire le lien entre le pré-signalosome et la formation de la synapse immunologique et l'activation.

Bien que nos expériences ne permettent pas de conclure à une interaction au sens propre du terme des protéines à l'antisynapse, il est néanmoins évident que ces protéines sont très proches les unes des autres comme le montrent les expériences de détection de proximité. De plus les protéines kinases recrutées à l'antisynapse semblent se trouver dans une configuration active puisque des tyrosines phosphorylées peuvent être détectées. Cet argument est renforcé par une étude précédente, menée par Clotilde Randriamampita et Annemarie Lellouch, qui montre que la kinase ZAP-70 est active à l'antisynapse (Randriamampita et al., 2008). Pour conclure à une interaction stricte entre toutes ces protéines, il serait intéressant de marquer en même temps plusieurs protéines recrutées à l'antisynapse et de les analyser par microscopie STORM. Cette méthode a l'avantage de donner une localisation à l'échelle de la molécule unique et de préciser les distances entre chacune avec une résolution de 10 nm. Nous avons déjà commencé à mettre au point ce type d'expérience avec l'aide de la plateforme d'imagerie photonique de l'institut Cochin.

L'assemblage des pré-signalosomes à l'antisynapse pourrait constituer une étape intermédiaire avant leur passage à la synapse immunologique. Une étude a d'ailleurs montré que l'activation des protéines ne survenait pas forcément à la synapse immunologique. Le recrutement tardif de LAT, à la zone de contact, à partir du pool intracellulaire, est en effet dépendant de la phosphorylation de ses tyrosines. Il y a donc une nécessité d'activer LAT ailleurs dans la cellule pour permettre son recrutement à la synapse immunologique (Bonello et al., 2004). Son activateur, la kinase ZAP-70, a été retrouvée à l'antisynapse, dans la même fenêtre de temps (Randriamampita et al., 2008) et pourrait jouer ce rôle.

Une autre étude suggère que la chaîne CD3 ϵ est plus facilement recrutée à la synapse immunologique si elle est concentrée au préalable à l'antisynapse. Basée sur l'observation que le PIP₂ est important pour le recrutement de certains marqueurs, cette étude a utilisé une chaîne de CD3 ϵ dont le domaine de liaison à ce phosphoinositide a été muté. Des cellules transfectées avec une construction codant pour cette chaîne montrent un défaut de recrutement du CD3 ϵ à la fois à l'antisynapse mais également à la synapse (DeFord-Watts et al., 2011).

En conséquent, les protéines LAT et CD3 ϵ pourraient faire un passage à l'antisynapse avant d'être mobilisées à la synapse immunologique.

Étant donné que la synapse immunologique représente la plateforme à partir de laquelle les micro-clusters de signalisation initient l'activation des cellules T, on peut se demander si la formation de pré-signalosomes à l'antisynapse, favorisant la formation de la synapse immunologique, agit sur l'activation. Pour répondre à cette question, il serait intéressant d'observer l'effet de la stabilisation de l'antisynapse sur l'architecture de la synapse ainsi que l'activation. Deux études, réalisées dans ces conditions, ont analysé un événement précoce (la réponse calcique) et un autre tardif de l'activation (la production d'IL-2).

Une altération du cytosquelette de microtubules, en plus de stabiliser l'antisynapse comme montré dans notre étude, peut également inhiber les signaux initiateurs de l'activation comme l'influx calcique (Delon et al., 1998a).

Le PIP₂, produit par la PIP5K β et γ , est retrouvé au pôle distal, et représente un point d'ancrage pour de nombreuses protéines dont CD3 et la PLC γ . Une augmentation de sa production à l'antisynapse, grâce à la surexpression des PIP5K distales, entraîne une nette diminution de la production d'IL-2 (Sun et al., 2011). Dans cette condition, on peut supposer que le recrutement des protéines à l'antisynapse est stabilisé grâce à une production importante de PIP₂. Une diminution de la production de PIP₂ à l'antisynapse par l'inhibition des PIP5K distales entraîne en revanche une augmentation de la production d'IL-2 (Sun et al., 2011). Dans cette condition, le recrutement des protéines à l'antisynapse doit probablement être altéré en raison de l'absence de points d'ancrage PIP₂ pour les protéines.

Ces études montrent qu'une séquestration des protéines à l'antisynapse inhibe l'activation de la cellule T.

En conclusion, nous avons montré que des pré-signalosomes peuvent être assemblés à l'opposé de la zone de contact, à partir de protéines pré-activées. Cela remet en cause, l'idée communément admise, que l'assemblage du signalosome s'établit à proximité des motifs ITAM phosphorylés des chaînes CD3, après l'engagement du TCR, à la zone de contact. Les pré-signalosomes de l'antisynapse pourraient ensuite être mobilisés à la synapse pour améliorer le déclenchement de l'activation des cellules T.

4. CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux de thèse nous ont permis d'approfondir nos connaissances sur une structure, l'antisynapse, qui survient dans les lymphocytes T à l'opposé de la synapse immunologique. Cette structure apparaît très précocement, en réponse à un signal d'adhésion et ne dure que quelques minutes avant de disparaître. Une partie des protéines qui composent l'antisynapse est rapidement mobilisée à la synapse, lorsque celle-ci se forme, en réponse à un signal TCR (Figure 40).

Dans un contexte physiologique, où les cellules T établissent de nombreux contacts, cette structure pourrait jouer un rôle primordial en contribuant à l'architecture de la synapse immunologique par un approvisionnement de complexes préformés, qui aurait lieu seulement dans des conditions de stimulations antigéniques spécifiques. Cette contribution pourrait avoir comme conséquence, d'optimiser l'activation lymphocytaire.

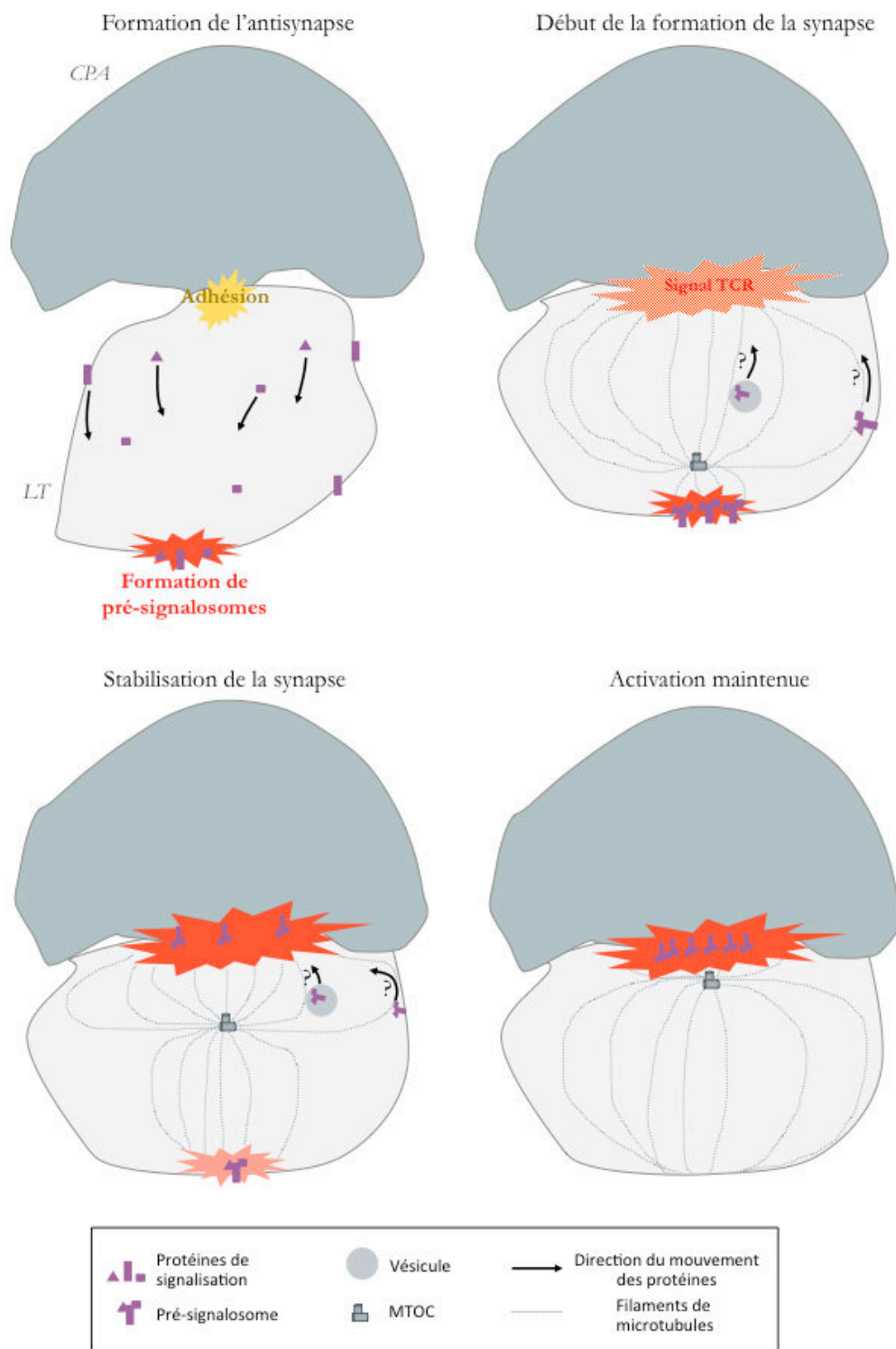


Figure 40: Schéma récapitulatif de la régulation de l'antisynapse

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. CULTURE CELLULAIRE

Les cellules T Jurkat (J77 clone 20 ou E6.1) et les cellules B Raji ont été offertes par Georges Bismuth (Institut Cochin, Paris). Les Jurkats J31.13 proviennent d'O. Acuto (Oxford university) et JRT3 de J. Dechanet Merville (Université Segalen de Bordeaux). Toutes ces cellules ont été cultivées dans une étuve à 37°C, 5% CO₂, dans du milieu RPMI (Seromed, VWR, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher, France), d'antibiotiques (pénicilline 50 u/ml, Streptomycine 50µg/ml, GIBCO), de glutamine (4mM, GIBCO) et de sodium pyruvate (1mM, GIBCO).

Les lymphocytes T et les monocytes primaires humains ont été purifiés à partir de sang humain issu de donneurs sains (Établissement Français du sang). Les cellules ont été purifiées à partir d'un cône d'aphérèse sur gradient de Ficoll avant une sélection négative grâce à un kit (Human T cell isolation kit, EasySep) pour récupérer les cellules T (PBT) ou une sélection positive par CD14 (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec) pour récupérer les monocytes.

Les lymphocytes T ont été cultivés dans du milieu RPMI (Seromed, VWR, France), supplémenté de 10% de sérum AB, d'antibiotiques (pénicilline 50 u/ml, Streptomycine 50µg/ml, GIBCO), de glutamine (4mM, GIBCO) et de sodium pyruvate (1mM, GIBCO). Les monocytes ont été différenciés dans du milieu RPMI (Seromed, VWR, France) supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (Dominique Dutscher, France), de GM-CSF (50ng/mL) et d'IL4 (40ng/mL), d'antibiotiques (pénicilline 50 u/ml, Streptomycine 50µg/ml, GIBCO), de glutamine (4mM, GIBCO) et de sodium pyruvate (1mM, GIBCO). Après 6 jours, les CD immatures ont été décollées et mises à maturer toute une nuit avec 10ng/mL de LPS.

2. SOURIS

Les souris C57BL/6J proviennent de chez Charles River. Les soins portés aux animaux ont été réalisés par les techniciens et vétérinaires de l'animalerie de l'institut Cochin.

3. ANTICORPS ET PRODUITS

Le superantigène (SAg) est un mélange de protéines recombinantes de staphylococcal enterotoxin E, staphylococcal enterotoxin A, staphylococcal enterotoxin B, et staphylococcal enterotoxin C3 (Toxin Technology).

Les cellules humaines ont été marquées avec des anticorps contre CD3-ζ (sc20919, Santa Cruz), CD4-Alexa Fluor 647 (557707, BD), CD43 (555474, BD), LAT (sc7948, Santa Cruz), Lck (sc433, Santa Cruz) (sc13, Santa Cruz), PKCθ (sc212, Santa Cruz), PLCγ1 (sc7290, Santa Cruz) (sc81, Santa Cruz), Pericentrin (ab4448, Abcam), Phospho Tyr402 Pyk2 (44618, Invitrogen), phospho-Tyr418-Src (44660, Invitrogen), Alpha-Tubulin (T9026, Sigma), Phospho-ERK (Sigma), PIP₂ (PerSeptive Biosystems), Phospho-Tyrosine (9411, Cell Signaling). Nous avons utilisé des anticorps secondaires couplés aux Alexa-Fluor-647, Alexa-Fluor-568 et Alexa-Fluor-488 Donkey anti Mouse et Alexa-Fluor-647, Alexa-Fluor-568 et Alexa-Fluor-488 Donkey-anti-Rabbit (Invitrogen). Les cellules T ont été stimulées avec un anti CD3-ζ (550367, BD) quand

spécifié. Les cellules murines ont été marquées avec des anticorps anti-B220-Alexa Fluor-647 (557683, BD), CD3ε-PE (12-0033, eBioscience).

Les billes ont été recouvertes avec des anticorps contre CD11a (ab3981, Abcam) pour bloquer LFA-1 dans sa conformation de haute affinité, CD11a (217640, Calbiochem) pour bloquer LFA-1 dans sa conformation de basse affinité, CD18 (555922, BD), CD54 (559047, BD), CD3 (555329, BD), CD28 (555725, BD). Le marquage de l'actine a été réalisé avec la Phalloïdine-Alexa Fluor 594 (A12381, Invitrogen). Les noyaux ont été marqués avec 1 µg/mL de Hoechst 33258 (Sigma). L'inhibiteur des Src kinases, le PP2 (529576, Calbiochem) a été utilisé à 10µM. La latrunculin A (Alexis, Biochemical) a été utilisée à 10 nM et 500 nM. Le nocodazole (487928, Calbiochem) a été utilisé à 10 µM.

4. CONSTRUCTIONS

P85-YFP (pEYFP-C1), Akt-PH-YFP (pEYFP-C1) et CD3-YFP (pEYFP-C1) ont été fournies par Georges Bismuth. mLck YFP a été obtenu à partir de mLck-GFP fourni par Anne-Marie Lellouch (INSERM U1067, Marseille, France) et pEYFP-C1 (Clontech). HsCentrin1-CFP (pECFP-C1) a été obtenu à partir du plasmide HsCentrin1-GFP (pEGFP-C1) fourni par Annie Delouée (Institut Curie, Paris, France). Lck-Dendra2 (pDendra2-N) a été crée à partir du plasmide pDendra2-N (Clontech) et du fragment Lck amplifié à partir du plasmide Lck-GFP (pECFP-N1) (fourni par Vincent Feuillet, institut Cochin, Paris, France). La validation des constructions a été réalisée par l'analyse des profils de digestion et par le séquençage des inserts. Le séquençage a été réalisé par Eurofins (mwg/operons, Paris, France).

5. TRANSFECTION

Les cellules Jurkat J77 Clone 20 ont été transfectées par un système classique d'électroporation (Biorad). Pour ce faire, 5 millions de cellules ont été incubées 5 minutes à température ambiante dans du milieu RPMI (sans sérum) avec 5µg de la construction à exprimer, puis électroporées en utilisant les paramètres suivants : 290V, 950 µF, puis laissées dans du milieu complet sur la nuit à la concentration de 1 million de cellules/mL.

Les lymphocytes T primaires ont été transfectés avec 5 µg d'ADN pour 5 millions de cellules par nucléofection (système Amaxa) avec la solution dédiée aux cellules T humaines (Human T cell solution, Lonza) selon les recommandations du manufacturier et en utilisant le programme U014. Les cellules transfectées et nucléofectées ont été utilisées après 24 heures.

6. FORMATION DES CONJUGUÉS

Pour les conjugués fixés Raji/Jurkat ou CDm/PBT : Pour les couples Raji/Jurkat, les cellules ont été mélangées au ratio de 1:2 et pour le couple CDm/PBT au ratio de 0,7/1. Les cellules Raji ou les CDm ont été chargées avec 200ng/mL de superantigène (sauf quand cela est spécifié) dans du milieu sans sérum, sur des lamelles pendant 30 min à 37°C. Quand indiqué, les cellules T ont été incubées avec du nocodazole, de la latrunculine A ou du PP2 dans du milieu sans sérum pendant 30 min à 37°C. Les cellules T ont ensuite été rincées (sauf pour le PP2 qui est hautement réversible) puis déposées sur les CPA. Les

conjugués ont été fixés à différents temps dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 min. Pour les conjugués synchronisés, les Raji et les Jurkat ont été mélangées au ratio de 1 :1 par centrifugation dans un tube. Les conjugués sont fixés, puis rincés trois fois dans du PBS et BSA à 0,5%. Ils sont ensuite laissés sur une lamelle recouverte de Poly-L-Lysine (P8920, Sigma Aldrich) pendant une heure avant les marquages.

Pour les conjugués Raji/Jurkat en vidéo-microscopie : Les cellules Raji sont incubées dans des boîtes à fond en verre de 35 mm, pendant 30 min dans du milieu sans sérum avec du SAg à 200ng/mL à 37°C. Les cellules T ont été chargées en Fura2/AM à 0,5 µM pendant 20 min. Après le rinçage des cellules Raji, les boîtes sont placées sur la lentille de l'objectif et les cellules T sont ajoutées. Ces expériences ont été réalisées à 37°C dans un milieu salin (140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, 11mM glucose).

Pour les conjugués Billes/PBT : Des billes de 4,5 µm de diamètre (Dynabeads Pan Mouse IgG, 110.41, Invitrogen) ont été recouvertes suivant les conseils du fabricant, puis déposées sur des lamelles. Les lamelles ont été placées, au préalable, sur un aimant recouvert de parafilm et ont été maintenues sur ce support jusqu'au montage pour éviter la perte des conjugués durant les lavages successifs. Les cellules T ont été déposées et les conjugués ont ensuite été fixés à différents temps dans du paraformaldéhyde à 4% pendant 10 minutes.

7. TRANCHES DE GANGLIONS LYMPHATIQUES

Les ganglions lymphatiques inguinaux ont été isolés d'une souris C57Bl/6J puis fixés dans une solution Periodate-Lysin-Paraformaldéhyde pendant 3 heures. Les ganglions ont été préparés comme décrit précédemment (Asperti-Boursin et al., 2007, Salmon et al., 2011). Pour résumer, les ganglions ont été maintenus dans un gel d'agarose à 5% (type VII-A; Sigma-Aldrich) préparé à base de PBS. Des tranches de 250 µm ont été coupées à l'aide d'un vibratome (VT 1000S; Leica) dans un bain de PBS.

8. LES MARQUAGES EN IMMUNOFLUORESCENCE

Pour les conjugués fixés: le marquage et la perméabilisation ont été réalisés dans du PBS, avec 0,5% de BSA et 0,1% de saponine. Les anticorps primaires puis secondaires ont été incubés 30 min à température ambiante. L'Hoechst et la phalloïdine ont été incubés pendant 15 min. Trois rinçages dans le même milieu ont été réalisés entre toutes ces étapes. A la fin, les lamelles ont été lavées dans du PBS puis montées avec le milieu FluorSave (Merck Millipore) sur une lame.

Pour les tranches : les tranches ont été transférées sur des filtres organotypiques de 0,4 µm (Millicell, Millipore) dans des plaques de 6 puits contenant 1 mL de PBS. Des joints en acier avec un diamètre interne de 4 mm ont été placés sur chacune des tranches. Les anticorps primaires intracellulaires, mélangés dans 20 µL de PBS avec 0,5% de BSA et 0,1% de saponine, ont été déposés dans la partie interne du joint et laissés pendant 15 min à température ambiante. Après le rinçage, les anticorps intracellulaires secondaires ont été déposés de la même manière et laissés pendant 15 min à température ambiante. Les tranches ont ensuite été rincées une fois dans le même milieu puis une fois en PBS. A la fin, les joints ont

été retirés et les tranches déposées (faces marquées vers le haut) sur une lame avec une goutte de PBS puis recouvertes avec une lamelle en verre de 24 x 50 mm.

Expériences de détections de proximité de liaison : ces expériences ont été réalisées suivant les recommandations du kit Duolink II (92007-003, Olink Bioscience). La détection de la proximité entre deux protéines est permise grâce à l'hybridation de deux séquences nucléotidiques fixées aux anticorps secondaires. L'hybridation entraîne, en présence de polymérase et de dNTP, une réaction de PCR locale. Les séquences amplifiées peuvent ensuite être détectées par une sonde fluorescente.

Cytométrie en flux : les cellules ont été fixées pendant 10 min dans du paraformaldéhyde à 4%, à température ambiante. Les anticorps primaires et secondaires, dans du PBS avec 0,5% de BSA, ont été incubés avec les cellules pendant 30 min à température ambiante.

9. CYTOMÉTRIE EN FLUX

Les expériences ont été réalisées avec un FACScalibur (BD Biosciences). L'acquisition a été réalisée à l'aide du logiciel CellQuest Pro (BD). Les données ont été analysées avec le logiciel Flow Jo.

10. MESURE DE CALCIUM PAR SPECTROFLUORIMÉTRIE

Pour tester l'efficacité du BAPTA et du PP2, les cellules T ont été incubées pendant 20 min à 37°C avec 1,5 μ M de Fura2/AM (MolecularProbes). Les mesures ont été réalisées dans du milieu salin (140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, 11mM glucose) par spectrofluorimétrie comme décrit précédemment (Randriamampita et al., 2003) avec le spectrofluorimètre Cary Eclipse (Varian) (excitation : 340 et 380 nm, émission : 510 nm). Les cellules ont été stimulées avec 5 μ g/mL d'anti CD3.

11. IMAGERIE

Les conjugués fixés ont été imagés sur un microscope inversé DMI6000 (Leica) équipé d'une tête de spinning-disk (Yokogawa CSU-X1M1), d'objectifs 60x/NA:1.4 et 40x/NA:1.4 et une caméra CoolSnap HQ2 (Photometrics) (pixels de 6.45 μ m). Les expériences de vidéo-microscopie ont été réalisées à 37°C avec un microscope inversé à champ-large (Nikon TE300) avec les objectifs Plan Apo 60x/1.4 et S Fluor 40x/1.3 et une caméra Cascade 1K (Photometrics) avec une taille de pixel de 8 μ m. les expériences de photo-conversion ont été réalisées avec un microscope inversé à champ-large iMic (TILL Photonics) équipé d'un scanner Yanus IV (TILL Photonics) pour la photo-conversion en un point spécifique, des lasers à 405nm, 491nm, 561nm et 640nm et une camera iXonEM (Andor Technology) avec une taille de pixel de 16 μ m. L'acquisition des images a été réalisées avec les logiciels MetaFluor, Metavue (Molecular Devices) et Live Acquisition (TILL Photonics). Les images et les films ont été analysés sur le logiciel ImageJ. A l'exception du Nikon TE300, tous ces microscopes ont été utilisés sur la plateforme d'imagerie photonique de l'institut Cochin.

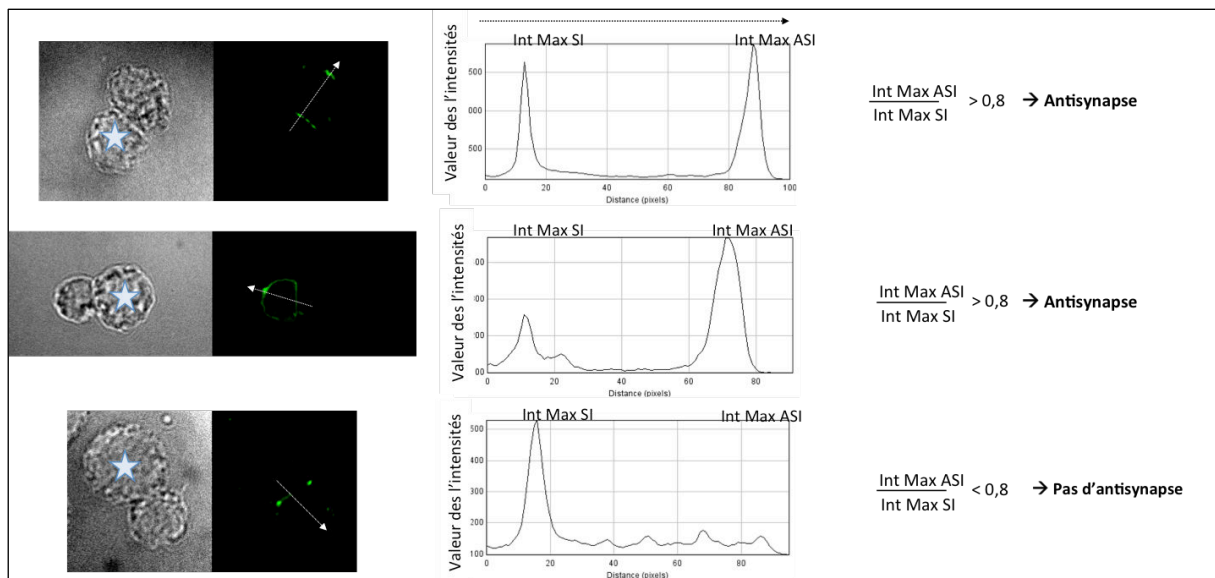
12. STATISTIQUES

Les moyennes sont exprimées \pm SE, et la signifiante des différences a été évaluée avec un test de student t-test. Les logiciels de statistiques GraphPad Prism et Kaleidagraph ont été utilisés pour analyser les données.

13. DÉTERMINATION DES ANTISYNAPSES

Les antisynapses ont été déterminées selon l'intensité du marqueur à l'opposé de la zone de contact. Si la valeur maximale de l'intensité du marqueur à la zone opposée du contact correspond au minimum à 80% de la valeur maximale de l'intensité du marqueur à la zone de contact, nous considérons alors qu'il y a une antisynapse.

Pour obtenir les valeurs d'intensité maximales, nous générons l'histogramme des valeurs d'une ligne qui traverse la cellule de la zone de contact à l'opposé grâce à ImageJ.



BIBLIOGRAPHIE

- Acuto, O., and Michel, F. (2003). CD28-mediated co-stimulation: a quantitative support for TCR signalling. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 939–951.
- Agata, Y., Kawasaki, A., Nishimura, H., Ishida, Y., Tsubata, T., Yagita, H., and Honjo, T. (1996). Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. *Int. Immunol.* *8*, 765–772.
- Alcover, A., Mariuzza, R.A., Ermonval, M., and Acuto, O. (1990). Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J. Biol. Chem.* *265*, 4131–4135.
- Allenspach, E.J., Cullinan, P., Tong, J., Tang, Q., Tesciuba, A.G., Cannon, J.L., Takahashi, S.M., Morgan, R., Burkhardt, J.K., and Sperling, A.I. (2001). ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity* *15*, 739–750.
- Ambach, A., Saunus, J., Konstandin, M., Wesselborg, S., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (2000). The serine phosphatases PP1 and PP2A associate with and activate the actin-binding protein cofilin in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3422–3431.
- Von Andrian, U.H., and Mempel, T.R. (2003). Homing and cellular traffic in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 867–878.
- Andzelm, M.M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J.S., and Strominger, J.L. (2007). Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2285–2291.
- Anikeeva, N., Somersalo, K., Sims, T.N., Thomas, V.K., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2005). Distinct role of lymphocyte function-associated antigen-1 in mediating effective cytolytic activity by cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6437–6442.
- Antón, O., Batista, A., Millán, J., Andrés-Delgado, L., Puertollano, R., Correas, I., and Alonso, M.A. (2008). An essential role for the MAL protein in targeting Lck to the plasma membrane of human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *205*, 3201–3213.
- Antón, O.M., Andrés-Delgado, L., Reglero-Real, N., Batista, A., and Alonso, M.A. (2011). MAL protein controls protein sorting at the supramolecular activation cluster of human T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 6345–6356.
- Appleman, L.J., van Puijenbroek, A.A.F.L., Shu, K.M., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. (2002).

CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *168*, 2729–2736.

Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase-independent manner. *J. Exp. Med.* *204*, 1167–1179.

Avalos, A.M., and Ploegh, H. (2014). Early BCR events and antigen capture, processing, and loading on MHC class II on B cells. *Antigen Present. Cell Biol.* *5*, 92.

Azar, G.A., Lemaître, F., Robey, E.A., and Bousso, P. (2010). Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 3675–3680.

Babich, A., and Burkhardt, J.K. (2011). Lymphocyte Signaling Converges on Microtubules. *Immunity* *34*, 825–827.

Bachmann, M.F., Gallimore, A., Jones, E., Ecabert, B., Acha-Orbea, H., and Kopf, M. (2001). Normal pathogen-specific immune responses mounted by CTLA-4-deficient T cells: a paradigm reconsidered. *Eur. J. Immunol.* *31*, 450–458.

Badour, K., Zhang, J., Shi, F., McGavin, M.K.H., Rampersad, V., Hardy, L.A., Field, D., and Siminovitch, K.A. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein acts downstream of CD2 and the CD2AP and PSTPIP1 adaptors to promote formation of the immunological synapse. *Immunity* *18*, 141–154.

Balaji, K.N., Schaschke, N., Machleidt, W., Catalfamo, M., and Henkart, P.A. (2002). Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* *196*, 493–503.

Barber, E.K., Dasgupta, J.D., Schlossman, S.F., Trevillyan, J.M., and Rudd, C.E. (1989). The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *86*, 3277–3281.

Barcia, C., Thomas, C.E., Curtin, J.F., King, G.D., Wawrowsky, K., Candolfi, M., Xiong, W.-D., Liu, C., Kroeger, K., Boyer, O., et al. (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *J. Exp. Med.* *203*, 2095–2107.

Baroja, M.L., Vijayakrishnan, L., Bettelli, E., Darlington, P.J., Chau, T.A., Ling, V., Collins, M.,

- Carreno, B.M., Madrenas, J., and Kuchroo, V.K. (2002). Inhibition of CTLA-4 function by the regulatory subunit of serine/threonine phosphatase 2A. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *168*, 5070–5078.
- Barr, V.A., Bernot, K.M., Srikanth, S., Gwack, Y., Balagopalan, L., Regan, C.K., Helman, D.J., Sommers, C.L., Oh-Hora, M., Rao, A., et al. (2008). Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2802–2817.
- Barr, V.A., Bernot, K.M., Shaffer, M.H., Burkhardt, J.K., and Samelson, L.E. (2009). Formation of STIM and Orai complexes: puncta and distal caps. *Immunol. Rev.* *231*, 148–159.
- Barreiro, O., De La Fuente, H., Mittelbrunn, M., and Sánchez-Madrid, F. (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol. Rev.* *218*, 147–164.
- Barthel, A., Okino, S.T., Liao, J., Nakatani, K., Li, J., Whitlock, J.P., and Roth, R.A. (1999). Regulation of GLUT1 Gene Transcription by the Serine/Threonine Kinase Akt1. *J. Biol. Chem.* *274*, 20281–20286.
- Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 15–27.
- Batista, A., Millán, J., Mittelbrunn, M., Sánchez-Madrid, F., and Alonso, M.A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *172*, 6709–6714.
- Beal, A.M., Anikeeva, N., Varma, R., Cameron, T.O., Vasiliver-Shamis, G., Norris, P.J., Dustin, M.L., and Sykulev, Y. (2009). Kinetics of Early T Cell Receptor Signaling Regulate the Pathway of Lytic Granule Delivery to the Secretory Domain. *Immunity* *31*, 632–642.
- Beemiller, P., Jacobelli, J., and Krummel, M.F. (2012). Integration of the movement of signaling microclusters with cellular motility in immunological synapses. *Nat. Immunol.* *13*, 787–795.
- Bertrand, F., Esquerré, M., Petit, A.-E., Rodrigues, M., Duchez, S., Delon, J., and Valitutti, S. (2010). Activation of the ancestral polarity regulator protein kinase C zeta at the immunological synapse drives polarization of Th cell secretory machinery toward APCs. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 *185*, 2887–2894.
- Bertrand, F., Müller, S., Roh, K.-H., Laurent, C., Dupré, L., and Valitutti, S. (2013). An initial and

rapid step of lytic granule secretion precedes microtubule organizing center polarization at the cytotoxic T lymphocyte/target cell synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, 6073–6078.

Bhakta, N.R., Oh, D.Y., and Lewis, R.S. (2005). Calcium oscillations regulate thymocyte motility during positive selection in the three-dimensional thymic environment. *Nat. Immunol.* *6*, 143–151.

Bi, K., Tanaka, Y., Coudronniere, N., Sugie, K., Hong, S., van Stipdonk, M.J.B., and Altman, A. (2001). Antigen-induced translocation of PKC- θ to membrane rafts is required for T cell activation. *Nat. Immunol.* *2*, 556–563.

Bienvenu, B., Martin, B., Auffray, C., Cordier, C., Bécourt, C., and Lucas, B. (2005). Peripheral CD8+CD25+ T lymphocytes from MHC class II-deficient mice exhibit regulatory activity. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *175*, 246–253.

Bivona, T.G., Wiener, H.H., Ahearn, I.M., Silletti, J., Chiu, V.K., and Philips, M.R. (2004). Rap1 up-regulation and activation on plasma membrane regulates T cell adhesion. *J. Cell Biol.* *164*, 461–470.

Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C. (2002). In the Immune Synapse, ZAP-70 Controls T Cell Polarization and Recruitment of Signaling Proteins but Not Formation of the Synaptic Pattern. *Immunity* *17*, 389–399.

Bolomini-Vittori, M., Montresor, A., Giagulli, C., Staunton, D., Rossi, B., Martinello, M., Constantin, G., and Laudanna, C. (2009). Regulation of conformer-specific activation of the integrin LFA-1 by a chemokine-triggered Rho signaling module. *Nat. Immunol.* *10*, 185–194.

Boltjes, A., and van Wijk, F. (2014). Human Dendritic Cell Functional Specialization in Steady-State and Inflammation. *Front. Immunol.* *5*, 131.

Bonello, G., Blanchard, N., Montoya, M.C., Aguado, E., Langlet, C., He, H.-T., Nunez-Cruz, S., Malissen, M., Sanchez-Madrid, F., Olive, D., et al. (2004). Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J. Cell Sci.* *117*, 1009–1016.

Bornens, M. (2008). Organelle positioning and cell polarity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 874–886.

Bossi, G., Trambas, C., Booth, S., Clark, R., Stinchcombe, J., and Griffiths, G.M. (2002). The secretory synapse: the secrets of a serial killer. *Immunol. Rev.* *189*, 152–160.

- Bousso, P., and Robey, E. (2003). Dynamics of CD8+ T cell priming by dendritic cells in intact lymph nodes. *Nat. Immunol.* *4*, 579–585.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell – dendritic cell synapse. *Eur. J. Immunol.* *35*, 1741–1753.
- Brower, R.C., England, R., Takeshita, T., Kozlowski, S., Margulies, D.H., Berzofsky, J.A., and Delisi, C. (1994). Minimal requirements for peptide mediated activation of CD8+ CTL. *Mol. Immunol.* *31*, 1285–1293.
- Brown, A.C.N., Oddos, S., Dobbie, I.M., Alakoskela, J.-M., Parton, R.M., Eissmann, P., Neil, M.A.A., Dunsby, C., French, P.M.W., Davis, I., et al. (2011). Remodelling of cortical actin where lytic granules dock at natural killer cell immune synapses revealed by super-resolution microscopy. *PLoS Biol.* *9*, e1001152.
- Brown, M.J., Hallam, J.A., Colucci-Guyon, E., and Shaw, S. (2001). Rigidity of Circulating Lymphocytes Is Primarily Conferred by Vimentin Intermediate Filaments. *J. Immunol.* *166*, 6640–6646.
- Bruniquel, D., and Schwartz, R.H. (2003). Selective, stable demethylation of the interleukin-2 gene enhances transcription by an active process. *Nat. Immunol.* *4*, 235–240.
- Burakov, A., Nadezhdina, E., Slepchenko, B., and Rodionov, V. (2003). Centrosome positioning in interphase cells. *J. Cell Biol.* *162*, 963–969.
- Burkhardt, J.K., Carrizosa, E., and Shaffer, M.H. (2008). The Actin Cytoskeleton in T Cell Activation. *Annu. Rev. Immunol.* *26*, 233–259.
- Bustelo, X.R. (2002). Regulation of Vav proteins by intramolecular events. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *7*, d24–30.
- Calderwood, D.A., Yan, B., Pereda, J.M. de, Alvarez, B.G., Fujioka, Y., Liddington, R.C., and Ginsberg, M.H. (2002). The Phosphotyrosine Binding-like Domain of Talin Activates Integrins. *J. Biol. Chem.* *277*, 21749–21758.
- Call, M.E., Pyrdol, J., Wiedmann, M., and Wucherpfennig, K.W. (2002). The Organizing Principle in the Formation of the T Cell Receptor-CD3 Complex. *Cell* *111*, 967–979.
- Campello, S., Lacalle, R.A., Bettella, M., Mañes, S., Scorrano, L., and Viola, A. (2006). Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J. Exp. Med.* *203*, 2879–2886.

- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J. Exp. Med.* *202*, 1031–1036.
- Cannon, J.L., and Burkhardt, J.K. (2004). Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *173*, 1658–1662.
- Carreno, B.M., Bennett, F., Chau, T.A., Ling, V., Luxenberg, D., Jussif, J., Baroja, M.L., and Madrenas, J. (2000). CTLA-4 (CD152) can inhibit T cell activation by two different mechanisms depending on its level of cell surface expression. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *165*, 1352–1356.
- Cemerski, S., Das, J., Giurisato, E., Markiewicz, M.A., Allen, P.M., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2008). The balance between T cell receptor signaling and degradation at the center of the immunological synapse is determined by antigen quality. *Immunity* *29*, 414–422.
- Chan, A.C., Iwashima, M., Turck, C.W., and Weiss, A. (1992). ZAP-70: A 70 kd protein-tyrosine kinase that associates with the TCR ζ chain. *Cell* *71*, 649–662.
- Chan, A.C., Dalton, M., Johnson, R., Kong, G.H., Wang, T., Thoma, R., and Kurosaki, T. (1995). Activation of ZAP-70 kinase activity by phosphorylation of tyrosine 493 is required for lymphocyte antigen receptor function. *EMBO J.* *14*, 2499.
- Chapon, M., Randriamampita, C., Maubec, E., Badoual, C., Fouquet, S., Wang, S.-F., Marinho, E., Farhi, D., Garcette, M., Jacobelli, S., et al. (2011). Progressive upregulation of PD-1 in primary and metastatic melanomas associated with blunted TCR signaling in infiltrating T lymphocytes. *J. Invest. Dermatol.* *131*, 1300–1307.
- Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., and Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *J. Immunol.* *143*, 1283–1289.
- Chemin, K., Bohineust, A., Dogniaux, S., Tourret, M., Guégan, S., Miro, F., and Hivroz, C. (2012). Cytokine Secretion by CD4+ T Cells at the Immunological Synapse Requires Cdc42-Dependent Local Actin Remodeling but Not Microtubule Organizing Center Polarity. *J. Immunol.* *189*, 2159–2168.
- Chemnitz, J.M., Parry, R.V., Nichols, K.E., June, C.H., and Riley, J.L. (2004). SHP-1 and SHP-2 Associate with Immunoreceptor Tyrosine-Based Switch Motif of Programmed Death 1 upon Primary Human T Cell Stimulation, but Only Receptor Ligation Prevents T Cell Activation. *J. Immunol.* *173*, 945–954.

- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2007). Using photoactivatable fluorescent protein Dendra2 to track protein movement. *BioTechniques* 42, 553, 555, 557 passim.
- Cianferoni, A., Massaad, M., Feske, S., de la Fuente, M.A., Gallego, L., Ramesh, N., and Geha, R.S. (2005). Defective nuclear translocation of nuclear factor of activated T cells and extracellular signal-regulated kinase underlies deficient IL-2 gene expression in Wiskott-Aldrich syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* 116, 1364–1371.
- Cicala, C., Arthos, J., Ruiz, M., Vaccarezza, M., Rubbert, A., Riva, A., Wildt, K., Cohen, O., and Fauci, A.S. (1999). Induction of phosphorylation and intracellular association of CC chemokine receptor 5 and focal adhesion kinase in primary human CD4+ T cells by macrophage-tropic HIV envelope. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 420–426.
- Cicala, C., Arthos, J., Censoplano, N., Cruz, C., Chung, E., Martinelli, E., Lempicki, R.A., Natarajan, V., VanRyk, D., Daucher, M., et al. (2006). HIV-1 gp120 induces NFAT nuclear translocation in resting CD4+ T-cells. *Virology* 345, 105–114.
- Claman, H.N., Chaperon, E.A., and Triplett, R.F. (1966). Immunocompetence of transferred thymus-marrow cell combinations. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 97, 828–832.
- Clark, C.E., Hasan, M., and Bousso, P. (2011). A Role for the Immediate Early Gene Product c-fos in Imprinting T Cells with Short-Term Memory for Signal Summation. *PLoS ONE* 6, e18916.
- Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L.F., Kuhn, J., and Poenie, M. (2006). Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 14883–14888.
- Conche, C., Boulla, G., Trautmann, A., and Randriamampita, C. (2009). T Cell Adhesion Primes Antigen Receptor-Induced Calcium Responses through a Transient Rise in Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate. *Immunity* 30, 33–43.
- Contento, R.L., Campello, S., Trovato, A.E., Magrini, E., Anselmi, F., and Viola, A. (2010). Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling. *EMBO J.* 29, 4035–4047.
- Costello, P.S., Walters, A.E., Mee, P.J., Turner, M., Reynolds, L.F., Prisco, A., Sarnar, N., Zamoyska, R., and Tybulewicz, V.L. (1999). The Rho-family GTP exchange factor Vav is a critical transducer of T cell receptor signals to the calcium, ERK, and NF-kappaB pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3035–3040.

- Costello, P.S., Gallagher, M., and Cantrell, D.A. (2002). Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat. Immunol.* *3*, 1082–1089.
- Cullinan, P., Sperling, A.I., and Burkhardt, J.K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol. Rev.* *189*, 111–122.
- Cyster, J.G., Shotton, D.M., and Williams, A.F. (1991). The dimensions of the T lymphocyte glycoprotein leukosialin and identification of linear protein epitopes that can be modified by glycosylation. *EMBO J.* *10*, 893–902.
- Das, V., Nal, B., Dujancourt, A., Thoulouze, M.-I., Galli, T., Roux, P., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2004). Activation-Induced Polarized Recycling Targets T Cell Antigen Receptors to the Immunological Synapse: Involvement of SNARE Complexes. *Immunity* *20*, 577–588.
- Davignon, D., Martz, E., Reynolds, T., Kürzinger, K., and Springer, T.A. (1981). Monoclonal antibody to a novel lymphocyte function-associated antigen (LFA-1): mechanism of blockade of T lymphocyte-mediated killing and effects on other T and B lymphocyte functions. *J. Immunol.* *127*, 590–595.
- Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (2006). The kinetic-segregation model: TCR triggering and beyond. *Nat. Immunol.* *7*, 803–809.
- Davis, C.B., Dikic, I., Unutmaz, D., Hill, C.M., Arthos, J., Siani, M.A., Thompson, D.A., Schlessinger, J., and Littman, D.R. (1997). Signal transduction due to HIV-1 envelope interactions with chemokine receptors CXCR4 or CCR5. *J. Exp. Med.* *186*, 1793–1798.
- Davis, D.M., Chiu, I., Fassett, M., Cohen, G.B., Mandelboim, O., and Strominger, J.L. (1999). The human natural killer cell immune synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 15062–15067.
- DeFord-Watts, L.M., Tassin, T.C., Becker, A.M., Medeiros, J.J., Albanesi, J.P., Love, P.E., Wülfing, C., and van Oers, N.S.C. (2009). The Cytoplasmic Tail of the T Cell Receptor CD3 ϵ Subunit Contains a Phospholipid-Binding Motif that Regulates T Cell Functions. *J. Immunol.* *183*, 1055–1064.
- DeFord-Watts, L.M., Dougall, D.S., Belkaya, S., Johnson, B.A., Eitson, J.L., Roybal, K.T., Barylko, B., Albanesi, J.P., Wülfing, C., and van Oers, N.S.C. (2011). The CD3 Subunit Contains a Phosphoinositide-Binding Motif That Is Required for the Stable Accumulation of TCR-CD3 Complex at the Immunological Synapse. *J. Immunol.* *186*, 6839–6847.

- Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., and Trautmann, A. (1998a). Antigen-dependent and -independent Ca^{2+} Responses Triggered in T Cells by Dendritic Cells Compared with B Cells. *J. Exp. Med.* *188*, 1473–1484.
- Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R., and Trautmann, A. (1998b). Imaging antigen recognition by naive CD4^{+} T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of an intracellular calcium response. *Eur. J. Immunol.* *28*, 716–729.
- Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* *15*, 691–701.
- Derivery, E., Sousa, C., Gautier, J.J., Lombard, B., Loew, D., and Gautreau, A. (2009). The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev. Cell* *17*, 712–723.
- Dixit, N., Yamayoshi, I., Nazarian, A., and Simon, S.I. (2011). Migrational guidance of neutrophils is mechanotransduced via high-affinity LFA-1 and calcium flux. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 472–481.
- Donnadieu, E., Cefai, D., Tan, Y.P., Paresys, G., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1992). Imaging early steps of human T cell activation by antigen-presenting cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *148*, 2643–2653.
- Donnadieu, E., Bismuth, G., and Trautmann, A. (1994). Antigen recognition by helper T cells elicits a sequence of distinct changes of their shape and intracellular calcium. *Curr. Biol. CB* *4*, 584–595.
- Doucey, M.-A., Legler, D.F., Faroudi, M., Boucheron, N., Baumgaertner, P., Naecher, D., Cebecauer, M., Hudrisier, D., Rüegg, C., Palmer, E., et al. (2003). The $\beta 1$ and $\beta 3$ Integrins Promote T Cell Receptor-mediated Cytotoxic T Lymphocyte Activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 26983–26991.
- Duchez, S., Rodrigues, M., Bertrand, F., and Valitutti, S. (2011). Reciprocal polarization of T and B cells at the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *187*, 4571–4580.
- Dustin, M.L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol. Rev.* *221*, 77–89.
- Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature* *341*, 619–624.

- Dustin, M.L., Bromley, S.K., Kan, Z., Peterson, D.A., and Unanue, E.R. (1997). Antigen receptor engagement delivers a stop signal to migrating T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 3909–3913.
- Ebisuno, Y., Katagiri, K., Katakai, T., Ueda, Y., Nemoto, T., Inada, H., Nabekura, J., Okada, T., Kannagi, R., Tanaka, T., et al. (2010). Rap1 controls lymphocyte adhesion cascade and interstitial migration within lymph nodes in RAPL-dependent and -independent manners. *Blood* *115*, 804–814.
- Egen, J.G., and Allison, J.P. (2002). Cytotoxic T lymphocyte antigen-4 accumulation in the immunological synapse is regulated by TCR signal strength. *Immunity* *16*, 23–35.
- Ehrlich, L.I.R., Ebert, P.J.R., Krummel, M.F., Weiss, A., and Davis, M.M. (2002). Dynamics of p56lck translocation to the T cell immunological synapse following agonist and antagonist stimulation. *Immunity* *17*, 809–822.
- Eibert, S.M., Lee, K.-H., Pipkorn, R., Sester, U., Wabnitz, G.H., Giese, T., Meuer, S.C., and Samstag, Y. (2004). Cofilin peptide homologs interfere with immunological synapse formation and T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1957–1962.
- Evans, R., Lellouch, A.C., Svensson, L., McDowall, A., and Hogg, N. (2011). The Integrin LFA-1 Signals Through ZAP-70 to Regulate Expression of High-Affinity LFA-1 on T Lymphocytes. *Blood* *117*, 3331–3342.
- Fagerholm, S., Hilden, T.J., and Gahmberg, C.G. (2002). Lck tyrosine kinase is important for activation of the CD11a/CD18-integrins in human T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* *32*, 1670–1678.
- Faroudi, M., Utzny, C., Salio, M., Cerundolo, V., Guiraud, M., Müller, S., and Valitutti, S. (2003a). Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: Manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 14145–14150.
- Faroudi, M., Zaru, R., Paulet, P., Müller, S., and Valitutti, S. (2003b). Cutting Edge: T Lymphocyte Activation by Repeated Immunological Synapse Formation and Intermittent Signaling. *J. Immunol.* *171*, 1128–1132.
- Fernández-Arenas, E., Calleja, E., Martínez-Martín, N., Gharbi, S.I., Navajas, R., García-Medel, N., Penela, P., Alcamí, A., Mayor, F., Albar, J.P., et al. (2014). β -arrestin-1 mediates the TCR-triggered re-routing of distal receptors to the immunological synapse by a PKC-mediated mechanism. *EMBO J.* *33*, 559–577.

- Feuillet, V., Lucas, B., Di Santo, J.P., Bismuth, G., and Trautmann, A. (2005). Multiple survival signals are delivered by dendritic cells to naive CD4⁺ T cells. *Eur. J. Immunol.* *35*, 2563–2572.
- Filbert, E.L., Borgne, M.L., Lin, J., Heuser, J.E., and Shaw, A.S. (2012). Stathmin Regulates Microtubule Dynamics and Microtubule Organizing Center Polarization in Activated T Cells. *J. Immunol.* *188*, 5421–5427.
- Finetti, F., and Baldari, C.T. (2013). Compartmentalization of signaling by vesicular trafficking: a shared building design for the immune synapse and the primary cilium. *Immunol. Rev.* *251*, 97–112.
- Finetti, F., Paccani, S.R., Riparbelli, M.G., Giacomello, E., Perinetti, G., Pazour, G.J., Rosenbaum, J.L., and Baldari, C.T. (2009). Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1332–1339.
- Finetti, F., Paccani, S.R., Rosenbaum, J., and Baldari, C.T. (2011). Intraflagellar transport: a new player at the immune synapse. *Trends Immunol.* *32*, 139–145.
- Fischer, K.-D., Kong, Y.-Y., Nishina, H., Tedford, K., Marengère, L.E.M., Kozieradzki, I., Sasaki, T., Starr, M., Chan, G., Gardener, S., et al. (1998). Vav is a regulator of cytoskeletal reorganization mediated by the T-cell receptor. *Curr. Biol.* *8*, 554–S3.
- Fisher, P.J., Bulur, P.A., Vuk-Pavlovic, S., Prendergast, F.G., and Dietz, A.B. (2008). Dendritic cell microvilli: a novel membrane structure associated with the multifocal synapse and T-cell clustering. *Blood* *112*, 5037–5045.
- François Bach, J. (2003). Regulatory T cells under scrutiny. *Nat. Rev. Immunol.* *3*, 189–198.
- Frauwirth, K.A., Riley, J.L., Harris, M.H., Parry, R.V., Rathmell, J.C., Plas, D.R., Elstrom, R.L., June, C.H., and Thompson, C.B. (2002). The CD28 signaling pathway regulates glucose metabolism. *Immunity* *16*, 769–777.
- Friedl, P., and Bröcker, E.-B. (2002). TCR triggering on the move: diversity of T-cell interactions with antigen-presenting cells. *Immunol. Rev.* *186*, 83–89.
- Friedl, P., den Boer, A.T., and Gunzer, M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* *5*, 532–545.
- Fuchs, S., Rensing-Ehl, A., Speckmann, C., Bengsch, B., Schmitt-Graeff, A., Bondzio, I., Maul-Pavicic, A., Bass, T., Vraetz, T., Strahm, B., et al. (2012). Antiviral and regulatory T cell immunity in a patient with STIM1 deficiency. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *188*, 1523–1533.

- De la Fuente, M.A., Sasahara, Y., Calamito, M., Antón, I.M., Elkhail, A., Gallego, M.D., Suresh, K., Siminovitch, K., Ochs, H.D., Anderson, K.C., et al. (2007). WIP is a chaperone for Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 926–931.
- Galvagni, F., Baldari, C.T., Oliviero, S., and Orlandini, M. (2012). An apical actin-rich domain drives the establishment of cell polarity during cell adhesion. *Histochem. Cell Biol.* *138*, 419–433.
- Geiger, B., Rosen, D., and Berke, G. (1982). Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J. Cell Biol.* *95*, 137–143.
- Geijtenbeek, T.B., Torensma, R., van Vliet, S.J., van Duijnhoven, G.C., Adema, G.J., van Kooyk, Y., and Figdor, C.G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* *100*, 575–585.
- Geisler, C. (2004). TCR Trafficking in Resting and Stimulated T Cells. *Crit. Rev. Immunol.* *24*, 67–86.
- Gérard, A., Beemiller, P., Friedman, R.S., Jacobelli, J., and Krummel, M.F. (2013). Evolving immune circuits are generated by flexible, motile, and sequential immunological synapses. *Immunol. Rev.* *251*, 80–96.
- Gil, D., Schamel, W.W.A., Montoya, M., Sánchez-Madrid, F., and Alarcón, B. (2002). Recruitment of Nck by CD3 ϵ Reveals a Ligand-Induced Conformational Change Essential for T Cell Receptor Signaling and Synapse Formation. *Cell* *109*, 901–912.
- Girard, J.-P., Moussion, C., and Förster, R. (2012). HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 762–773.
- Gomes, E.R., Jani, S., and Gundersen, G.G. (2005). Nuclear Movement Regulated by Cdc42, MRCK, Myosin, and Actin Flow Establishes MTOC Polarization in Migrating Cells. *Cell* *121*, 451–463.
- Gomez, T.S., and Billadeau, D.D. (2009). A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev. Cell* *17*, 699–711.
- Gomez, T.S., McCarney, S.D., Carrizosa, E., Labno, C.M., Comiskey, E.O., Nolz, J.C., Zhu, P., Freedman, B.D., Clark, M.R., Rawlings, D.J., et al. (2006). HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse. *Immunity* *24*, 741–752.
- Gomez, T.S., Kumar, K., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Leibson, P.J., and Billadeau, D.D. (2007). Formins Regulate the Actin-Related Protein 2/3 Complex-Independent Polarization of the Centrosome to the Immunological Synapse. *Immunity* *26*, 177–190.

- Goodridge, H.S., Reyes, C.N., Becker, C.A., Katsumoto, T.R., Ma, J., Wolf, A.J., Bose, N., Chan, A.S.H., Magee, A.S., Danielson, M.E., et al. (2011). Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a phagocytic synapse. *Nature* 472, 471–475.
- Gorska, M.M., and Alam, R. (2012). A mutation in the human Uncoordinated 119 gene impairs TCR signaling and is associated with CD4 lymphopenia. *Blood* 119, 1399–1406.
- Gorska, M.M., Liang, Q., Karim, Z., and Alam, R. (2009). Uncoordinated 119 protein controls trafficking of Lck via the Rab11 endosome and is critical for immunological synapse formation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 1675–1684.
- Gotoh, T., Hattori, S., Nakamura, S., Kitayama, H., Noda, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Matsui, H., Hatase, O., and Takahashi, H. (1995). Identification of Rap1 as a target for the Crk SH3 domain-binding guanine nucleotide-releasing factor C3G. *Mol. Cell. Biol.* 15, 6746–6753.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The Immunological Synapse: A Molecular Machine Controlling T Cell Activation. *Science* 285, 221–227.
- Griffiths, G.M., Tsun, A., and Stinchcombe, J.C. (2010). The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis. *J. Cell Biol.* 189, 399–406.
- Gunn, M.D., Tangemann, K., Tam, C., Cyster, J.G., Rosen, S.D., and Williams, L.T. (1998). A chemokine expressed in lymphoid high endothelial venules promotes the adhesion and chemotaxis of naive T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 258–263.
- Gunzer, M., Schäfer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zänker, K.S., Bröcker, E.-B., Kämpgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen Presentation in Extracellular Matrix: Interactions of T Cells with Dendritic Cells Are Dynamic, Short Lived, and Sequential. *Immunity* 13, 323–332.
- Hailman, E., Burack, W.R., Shaw, A.S., Dustin, M.L., and Allen, P.M. (2002). Immature CD4(+)CD8(+) thymocytes form a multifocal immunological synapse with sustained tyrosine phosphorylation. *Immunity* 16, 839–848.
- Hanada, T., Lin, L., Chandy, K.G., Oh, S.S., and Chishti, A.H. (1997). Human Homologue of the Drosophila Discs Large Tumor Suppressor Binds to p56 lck Tyrosine Kinase and Shaker Type Kv1.3 Potassium Channel in T Lymphocytes. *J. Biol. Chem.* 272, 26899–26904.
- Hao, J.-J., Zhu, J., Zhou, K., Smith, N., and Zhan, X. (2005). The coiled-coil domain is required for HS1 to bind to F-actin and activate Arp2/3 complex. *J. Biol. Chem.* 280, 37988–37994.

- Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Ishihara, C., Sakuma, M., Kobayashi, W., and Saito, T. (2010). T-Cell Receptor Microclusters Critical for T-Cell Activation Are Formed Independently of Lipid Raft Clustering. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 3421–3429.
- Hashimoto-Tane, A., Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Sakuma, M., Ishihara, C., Tokunaga, M., and Saito, T. (2011). Dynein-Driven Transport of T Cell Receptor Microclusters Regulates Immune Synapse Formation and T Cell Activation. *Immunity* *34*, 919–931.
- Hogg, N., Patzak, I., and Willenbrock, F. (2011). The insider's guide to leukocyte integrin signalling and function. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 416–426.
- Holdorf, A.D., Lee, K.-H., Burack, W.R., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat. Immunol.* *3*, 259–264.
- Hooper, L.V., and Macpherson, A.J. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat. Rev. Immunol.* *10*, 159–169.
- Houk, A.R., Jilkin, A., Mejean, C.O., Boltyanskiy, R., Dufresne, E.R., Angenent, S.B., Altschuler, S.J., Wu, L.F., and Weiner, O.D. (2012). Membrane Tension Maintains Cell Polarity by Confining Signals to the Leading Edge during Neutrophil Migration. *Cell* *148*, 175–188.
- Huang, Y., and Burkhardt, J.K. (2007). T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *J. Cell Sci.* *120*, 723–730.
- Hume, D.A. (2008). Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth. *J. Immunol.* *181*, 5829–5835.
- Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C., and Davis, M.M. (2003). Continuous T cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* *4*, 749–755.
- Hurley, T.R., Hyman, R., and Sefton, B.M. (1993). Differential effects of expression of the CD45 tyrosine protein phosphatase on the tyrosine phosphorylation of the lck, fyn, and c-src tyrosine protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 1651–1656.
- Huse, M. (2012). Microtubule-organizing center polarity and the immunological synapse: protein kinase C and beyond. *Front. Immunol.* *3*, 235.
- Huse, M., Le Floch, A., and Liu, X. (2013). From lipid second messengers to molecular motors: microtubule-organizing center reorientation in T cells. *Immunol. Rev.* *256*, 95–106.
- Iezzi, G., Karjalainen, K., and Lanzavecchia, A. (1998). The Duration of Antigenic Stimulation Determines the Fate of Naive and Effector T Cells. *Immunity* *8*, 89–95.

- Igakura, T., Stinchcombe, J.C., Goon, P.K.C., Taylor, G.P., Weber, J.N., Griffiths, G.M., Tanaka, Y., Osame, M., and Bangham, C.R.M. (2003). Spread of HTLV-I Between Lymphocytes by Virus-Induced Polarization of the Cytoskeleton. *Science* *299*, 1713–1716.
- Ikebe, M., and Reardon, S. (1990). Phosphorylation of bovine platelet myosin by protein kinase C. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 2713–2720.
- Ilani, T., Vasiliver-Shamis, G., Vardhana, S., Bretscher, A., and Dustin, M.L. (2009). T cell antigen receptor signaling and immunological synapse stability require myosin IIA. *Nat. Immunol.* *10*, 531–539.
- Imboden, J.B., and Stobo, J.D. (1985). Transmembrane signalling by the T cell antigen receptor. Perturbation of the T3-antigen receptor complex generates inositol phosphates and releases calcium ions from intracellular stores. *J. Exp. Med.* *161*, 446–456.
- Imboden, J.B., Weiss, A., and Stobo, J.D. (1985). The antigen receptor on a human T cell line initiates activation by increasing cytoplasmic free calcium. *J. Immunol.* *134*, 663–665.
- Innocenti, M., Zucconi, A., Disanza, A., Frittoli, E., Areces, L.B., Steffen, A., Stradal, T.E.B., Di Fiore, P.P., Carlier, M.-F., and Scita, G. (2004). Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat. Cell Biol.* *6*, 319–327.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* *419*, 845–849.
- Jackman, R.P., Balamuth, F., and Bottomly, K. (2007). CTLA-4 differentially regulates the immunological synapse in CD4 T cell subsets. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *178*, 5543–5551.
- Jacobelli, J., Chmura, S.A., Buxton, D.B., Davis, M.M., and Krummel, M.F. (2004). A single class II myosin modulates T cell motility and stopping, but not synapse formation. *Nat. Immunol.* *5*, 531–538.
- Jain, J., McCaffrey, P.G., Miner, Z., Kerppola, T.K., Lambert, J.N., Verdine, G.L., Curran, T., and Rao, A. (1993). The T-cell transcription factor NFATp is a substrate for calcineurin and interacts with Fos and Jun. *Nature* *365*, 352–355.
- Jolly, C. (2004). HIV-1 Cell to Cell Transfer across an Env-induced, Actin-dependent Synapse. *J. Exp. Med.* *199*, 283–293.
- Jordan, M.S., Singer, A.L., and Koretzky, G.A. (2003). Adaptors as central mediators of signal transduction in immune cells. *Nat. Immunol.* *4*, 110–116.

- Kalergis, A.M., Boucheron, N., Doucey, M.A., Palmieri, E., Goyarts, E.C., Vegh, Z., Luescher, I.F., and Nathenson, S.G. (2001). Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex. *Nat. Immunol.* *2*, 229–234.
- Kanner, S.B., Grosmaire, L.S., Ledbetter, J.A., and Damle, N.K. (1993). Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *90*, 7099–7103.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* *4*, 741–748.
- Katagiri, K., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2004). Rap1-mediated Lymphocyte Function-associated Antigen-1 Activation by the T Cell Antigen Receptor Is Dependent on Phospholipase C- γ 1. *J. Biol. Chem.* *279*, 11875–11881.
- Kiema, T., Lad, Y., Jiang, P., Oxley, C.L., Baldassarre, M., Wegener, K.L., Campbell, I.D., Ylänne, J., and Calderwood, D.A. (2006). The Molecular Basis of Filamin Binding to Integrins and Competition with Talin. *Mol. Cell* *21*, 337–347.
- Kim, A.S., Kakalis, L.T., Abdul-Manan, N., Liu, G.A., and Rosen, M.K. (2000). Autoinhibition and activation mechanisms of the Wiskott-Aldrich syndrome protein. *Nature* *404*, 151–158.
- Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G.A., et al. (2006). The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 7130–7144.
- Kloc, M., Kubiak, J.Z., Li, X.C., and Ghobrial, R.M. (2014). The newly found functions of MTOC in immunological response. *J. Leukoc. Biol.* *95*, 417–430.
- Kolodney, M.S., and Elson, E.L. (1995). Contraction due to microtubule disruption is associated with increased phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *92*, 10252–10256.
- Komatsu, S., and Ikebe, M. (2007). The phosphorylation of myosin II at the Ser1 and Ser2 is critical for normal platelet-derived growth factor induced reorganization of myosin filaments. *Mol. Biol. Cell* *18*, 5081–5090.
- Kong, K.-F., Yokosuka, T., Canonigo-Balancio, A.J., Isakov, N., Saito, T., and Altman, A. (2011). A motif in the V3 domain of the kinase PKC- θ determines its localization in the immunological synapse and functions in T cells via association with CD28. *Nat. Immunol.* *12*, 1105–1112.

- Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *19*, 541–564.
- Krogsgaard, M., Li, Q., Sumen, C., Huppa, J.B., Huse, M., and Davis, M.M. (2005). Agonist/endogenous peptide–MHC heterodimers drive T cell activation and sensitivity. *Nature* *434*, 238–243.
- Kuhn, J.R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* *16*, 111–121.
- Kuhné, M.R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M.N., Ehrlich, L.I.R., Huppa, J., Davis, M.M., and Weiss, A. (2003). Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *171*, 860–866.
- Kumar, A., Kremer, K.N., Dominguez, D., Tadi, M., and Hedin, K.E. (2011). Gα13 and Rho mediate endosomal trafficking of CXCR4 into Rab11+ vesicles upon stromal cell-derived factor-1 stimulation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 951–958.
- Kupfer, A., and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *133*, 2762–2766.
- Kupfer, A., Swain, S.L., Janeway, C.A., and Singer, S.J. (1986). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *83*, 6080–6083.
- Kupfer, A., Mosmann, T.R., and Kupfer, H. (1991). Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *88*, 775–779.
- Kurowska, M., Goudin, N., Nehme, N.T., Court, M., Garin, J., Fischer, A., de Saint Basile, G., and Ménasché, G. (2012). Terminal transport of lytic granules to the immune synapse is mediated by the kinesin-1/Slp3/Rab27a complex. *Blood* *119*, 3879–3889.
- Lad, Y., Jiang, P., Ruskamo, S., Harburger, D.S., Ylänné, J., Campbell, I.D., and Calderwood, D.A. (2008). Structural basis of the migfilin-filamin interaction and competition with integrin beta tails. *J. Biol. Chem.* *283*, 35154–35163.
- Larghi, P., Williamson, D.J., Carpier, J.-M., Dogniaux, S., Chemin, K., Bohineust, A., Danglot, L., Gaus, K., Galli, T., and Hivroz, C. (2013). VAMP7 controls T cell activation by regulating the recruitment and phosphorylation of vesicular Lat at TCR-activation sites. *Nat. Immunol.* *14*, 723–731.

- Lasserre, R., Charrin, S., Cuhe, C., Danckaert, A., Thoulouze, M.-I., de Chaumont, F., Duong, T., Perrault, N., Varin-Blank, N., Olivo-Marin, J.-C., et al. (2010). Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlg1 and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J.* *29*, 2301–2314.
- Lee, C., Tomkowicz, B., Freedman, B.D., and Collman, R.G. (2005a). HIV-1 gp120-induced TNF- α production by primary human macrophages is mediated by phosphatidylinositol-3 (PI-3) kinase and mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways. *J. Leukoc. Biol.* *78*, 1016–1023.
- Lee, K.-H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). T Cell Receptor Signaling Precedes Immunological Synapse Formation. *Science* *295*, 1539–1542.
- Lee, K.-Y., D'Acquisto, F., Hayden, M.S., Shim, J.-H., and Ghosh, S. (2005b). PDK1 Nucleates T Cell Receptor-Induced Signaling Complex for NF- κ B Activation. *Science* *308*, 114–118.
- Leevers, S.J., and Marshall, C.J. (1992). Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J.* *11*, 569–574.
- Lewis, R.S. (2001). Calcium Signaling Mechanisms in T Lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.* *19*, 497–521.
- Ley, S.C., Marsh, M., Bebbington, C.R., Proudfoot, K., and Jordan, P. (1994). Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J. Cell Biol.* *125*, 639–649.
- Lim, T.S., Mortellaro, A., Lim, C.T., Hämmerling, G.J., and Ricciardi-Castagnoli, P. (2011). Mechanical Interactions between Dendritic Cells and T Cells Correlate with T Cell Responsiveness. *J. Immunol.* *187*, 258–265.
- Lin, J., and Weiss, A. (2001). T cell receptor signalling. *J. Cell Sci.* *114*, 243–244.
- Lin, J., Hou, K.K., Piwnica-Worms, H., and Shaw, A.S. (2009). The polarity protein Par1b/EMK/MARK2 regulates T cell receptor-induced microtubule-organizing center polarization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *183*, 1215–1221.
- Linsley, P.S., Greene, J.L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J.A., and Peach, R. (1994). Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* *1*, 793–801.

- Linsley, P.S., Bradshaw, J., Greene, J., Peach, R., Bennett, K.L., and Mittler, R.S. (1996). Intracellular trafficking of CTLA-4 and focal localization towards sites of TCR engagement. *Immunity* 4, 535–543.
- Liu, X., Kapoor, T.M., Chen, J.K., and Huse, M. (2013). Diacylglycerol promotes centrosome polarization in T cells via reciprocal localization of dynein and myosin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 11976–11981.
- Ludford-Menting, M.J., Oliaro, J., Sacirbegovic, F., Cheah, E.T.-Y., Pedersen, N., Thomas, S.J., Pasam, A., Iazzolino, R., Dow, L.E., Waterhouse, N.J., et al. (2005). A Network of PDZ-Containing Proteins Regulates T Cell Polarity and Morphology during Migration and Immunological Synapse Formation. *Immunity* 22, 737–748.
- Luton, F., Legendre, V., Gorvel, J.P., Schmitt-Verhulst, A.M., and Boyer, C. (1997). Tyrosine and serine protein kinase activities associated with ligand-induced internalized TCR/CD3 complexes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 158, 3140–3147.
- Mañes, S., Ana Lacalle, R., Gómez-Moutón, C., and Martínez-A, C. (2003). From rafts to crafts: membrane asymmetry in moving cells. *Trends Immunol.* 24, 320–326.
- Marais, R., Light, Y., Paterson, H.F., and Marshall, C.J. (1995). Ras recruits Raf-1 to the plasma membrane for activation by tyrosine phosphorylation. *EMBO J.* 14, 3136–3145.
- Martín-Cófreces, N.B., Sancho, D., Fernández, E., Vicente-Manzanares, M., Gordón-Alonso, M., Montoya, M.C., Michel, F., Acuto, O., Alarcón, B., and Sánchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 176, 4201–4207.
- Martín-Cófreces, N.B., Robles-Valero, J., Cabrero, J.R., Mittelbrunn, M., Gordón-Alonso, M., Sung, C.-H., Alarcón, B., Vázquez, J., and Sánchez-Madrid, F. (2008). MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J. Cell Biol.* 182, 951–962.
- McDonald, D., Wu, L., Bohks, S.M., KewalRamani, V.N., Unutmaz, D., and Hope, T.J. (2003). Recruitment of HIV and Its Receptors to Dendritic Cell-T Cell Junctions. *Science* 300, 1295–1297.
- Melar, M., Ott, D.E., and Hope, T.J. (2007). Physiological levels of virion-associated human immunodeficiency virus type 1 envelope induce coreceptor-dependent calcium flux. *J. Virol.* 81, 1773–1785.

- Melowic, H.R., Stahelin, R.V., Blatner, N.R., Tian, W., Hayashi, K., Altman, A., and Cho, W. (2007). Mechanism of diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase C θ . *J. Biol. Chem.* *282*, 21467–21476.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* *427*, 154–159.
- Mentlik, A.N., Sanborn, K.B., Holzbaur, E.L., and Orange, J.S. (2010). Rapid Lytic Granule Convergence to the MTOC in Natural Killer Cells Is Dependent on Dynein But Not Cytolytic Commitment. *Mol. Biol. Cell* *21*, 2241–2256.
- Mentzer, S.J., Burakoff, S.J., and Faller, D.V. (1986). Adhesion of T lymphocytes to human endothelial cells is regulated by the LFA-1 membrane molecule. *J. Cell. Physiol.* *126*, 285–290.
- Van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 47–55.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *EMBO J.* *17*, 6932–6941.
- Miki, H., Yamaguchi, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (2000). IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature* *408*, 732–735.
- Miller, M.J., Wei, S.H., Parker, I., and Cahalan, M.D. (2002). Two-Photon Imaging of Lymphocyte Motility and Antigen Response in Intact Lymph Node. *Science* *296*, 1869–1873.
- Miller, M.J., Hejazi, A.S., Wei, S.H., Cahalan, M.D., and Parker, I. (2004). T cell repertoire scanning is promoted by dynamic dendritic cell behavior and random T cell motility in the lymph node. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 998–1003.
- Miller, P.M., Folkmann, A.W., Maia, A.R.R., Efimova, N., Efimov, A., and Kaverina, I. (2009). Golgi-derived CLASP-dependent microtubules control Golgi organization and polarized trafficking in motile cells. *Nat. Cell Biol.* *11*, 1069–1080.
- Mingueneau, M., Sansoni, A., Grégoire, C., Roncagalli, R., Aguado, E., Weiss, A., Malissen, M., and Malissen, B. (2008). The proline-rich sequence of CD3 ϵ controls T cell antigen receptor expression on and signaling potency in preselection CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Nat. Immunol.* *9*, 522–532.

- Mitchell, J.S., Kanca, O., and McIntyre, B.W. (2002). Lipid microdomain clustering induces a redistribution of antigen recognition and adhesion molecules on human T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 2737–2744.
- Molon, B., Gri, G., Bettella, M., Gómez-Moutón, C., Lanzavecchia, A., Martínez-A, C., Mañes, S., and Viola, A. (2005). T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat. Immunol.* *6*, 465–471.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* *395*, 82–86.
- Mor, A., Wynne, J.P., Ahearn, I.M., Dustin, M.L., Du, G., and Philips, M.R. (2009). Phospholipase D1 Regulates Lymphocyte Adhesion via Upregulation of Rap1 at the Plasma Membrane. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 3297–3306.
- Moser, M., Bauer, M., Schmid, S., Ruppert, R., Schmidt, S., Sixt, M., Wang, H.-V., Sperandio, M., and Fässler, R. (2009). Kindlin-3 is required for $\beta 2$ integrin–mediated leukocyte adhesion to endothelial cells. *Nat. Med.* *15*, 300–305.
- Mossman, K.D., Campi, G., Groves, J.T., and Dustin, M.L. (2005). Altered TCR Signaling from Geometrically Repatterned Immunological Synapses. *Science* *310*, 1191–1193.
- Müller, A.J., Filipe-Santos, O., Eberl, G., Aebischer, T., Späth, G.F., and Bousso, P. (2012). CD4⁺ T cells rely on a cytokine gradient to control intracellular pathogens beyond sites of antigen presentation. *Immunity* *37*, 147–157.
- Murphy, K.M., and Reiner, S.L. (2002). The lineage decisions of helper T cells. *Nat. Rev. Immunol.* *2*, 933–944.
- Negulescu, P.A., Shastri, N., and Cahalan, M.D. (1994). Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *91*, 2873–2877.
- Nieto, M., Frade, J.M., Sancho, D., Mellado, M., Martinez-A, C., and Sánchez-Madrid, F. (1997). Polarization of chemokine receptors to the leading edge during lymphocyte chemotaxis. *J. Exp. Med.* *186*, 153–158.
- Nika, K., Soldani, C., Salek, M., Paster, W., Gray, A., Etzensperger, R., Fugger, L., Polzella, P., Cerundolo, V., Dushek, O., et al. (2010). Constitutively Active Lck Kinase in T Cells Drives Antigen Receptor Signal Transduction. *Immunity* *32*, 766–777.
- Nishida, N., Xie, C., Shimaoka, M., Cheng, Y., Walz, T., and Springer, T.A. (2006). Activation of Leukocyte $\beta 2$ Integrins by Conversion from Bent to Extended Conformations. *Immunity* *25*, 583–594.

- Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D., and Billadeau, D.D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr. Biol.* *16*, 24–34.
- Norcross, M.A. (1984). A SYNAPTIC BASIS FOR T-LYMPHOCYTE ACTIVATION. *Ann. Immunol.* *135D*, 113.
- Nzounza, P., Chazal, M., Guedj, C., Schmitt, A., Massé, J.-M., Randriamampita, C., Pique, C., and Ramirez, B.C. (2012). The scaffolding protein Dlg1 is a negative regulator of cell-free virus infectivity but not of cell-to-cell HIV-1 transmission in T cells. *PLoS One* *7*, e30130.
- Oppenheimer-Marks, N., Davis, L.S., Bogue, D.T., Ramberg, J., and Lipsky, P.E. (1991). Differential utilization of ICAM-1 and VCAM-1 during the adhesion and transendothelial migration of human T lymphocytes. *J. Immunol.* *147*, 2913–2921.
- Park, C.Y., Hoover, P.J., Mullins, F.M., Bachhawat, P., Covington, E.D., Raunser, S., Walz, T., Garcia, K.C., Dolmetsch, R.E., and Lewis, R.S. (2009a). STIM1 clusters and activates CRAC channels via direct binding of a cytosolic domain to Orai1. *Cell* *136*, 876–890.
- Park, S.-G., Schulze-Luehrman, J., Hayden, M.S., Hashimoto, N., Ogawa, W., Kasuga, M., and Ghosh, S. (2009b). The kinase PDK1 integrates T cell antigen receptor and CD28 coreceptor signaling to induce NF-kappaB and activate T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 158–166.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. (2005). CTLA-4 and PD-1 Receptors Inhibit T-Cell Activation by Distinct Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9543–9553.
- Patino-Lopez, G., Dong, X., Ben-Aissa, K., Bernot, K.M., Itoh, T., Fukuda, M., Kruhlak, M.J., Samelson, L.E., and Shaw, S. (2008). Rab35 and its GAP EPI64C in T cells regulate receptor recycling and immunological synapse formation. *J. Biol. Chem.* *283*, 18323–18330.
- Pedersen, L.B., and Rosenbaum, J.L. (2008). Intraflagellar transport (IFT) role in ciliary assembly, resorption and signalling. *Curr. Top. Dev. Biol.* *85*, 23–61.
- Perkins, D., Wang, Z., Donovan, C., He, H., Mark, D., Guan, G., Wang, Y., Walunas, T., Bluestone, J., Listman, J., et al. (1996). Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *156*, 4154–4159.
- Perugi, F., Muriaux, D., Ramirez, B.C., Chabani, S., Decroly, E., Darlix, J.-L., Blot, V., and Pique, C. (2009). Human Discs Large Is a New Negative Regulator of Human Immunodeficiency Virus-1 Infectivity. *Mol. Biol. Cell* *20*, 498–508.

- Peterson, E.J., Woods, M.L., Dmowski, S.A., Derimanov, G., Jordan, M.S., Wu, J.N., Myung, P.S., Liu, Q.-H., Pribila, J.T., Freedman, B.D., et al. (2001). Coupling of the TCR to Integrin Activation by SLAP-130/Fyb. *Science* *293*, 2263–2265.
- Picard, C., McCarl, C.-A., Papolos, A., Khalil, S., Lüthy, K., Hivroz, C., LeDeist, F., Rieux-Laucat, F., Rechavi, G., Rao, A., et al. (2009). STIM1 mutation associated with a syndrome of immunodeficiency and autoimmunity. *N. Engl. J. Med.* *360*, 1971–1980.
- Pipkin, M.E., and Lieberman, J. (2007). Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr. Opin. Immunol.* *19*, 301–308.
- Del Pozo, M.A., Sánchez-Mateos, P., Nieto, M., and Sánchez-Madrid, F. (1995). Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J. Cell Biol.* *131*, 495–508.
- Purbhoo, M.A., Irvine, D.J., Huppa, J.B., and Davis, M.M. (2004). T cell killing does not require the formation of a stable mature immunological synapse. *Nat. Immunol.* *5*, 524–530.
- Quann, E.J., Merino, E., Furuta, T., and Huse, M. (2009). Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat. Immunol.* *10*, 627–635.
- Quann, E.J., Liu, X., Altan-Bonnet, G., and Huse, M. (2011). A cascade of protein kinase C isozymes promotes cytoskeletal polarization in T cells. *Nat. Immunol.* *12*, 647–654.
- Quintana, A., Schwarz, E.C., Schwindling, C., Lipp, P., Kaestner, L., and Hoth, M. (2006). Sustained Activity of Calcium Release-activated Calcium Channels Requires Translocation of Mitochondria to the Plasma Membrane. *J. Biol. Chem.* *281*, 40302–40309.
- Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A.S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 14418–14423.
- Rak, G.D., Mace, E.M., Banerjee, P.P., Svitkina, T., and Orange, J.S. (2011). Natural killer cell lytic granule secretion occurs through a pervasive actin network at the immune synapse. *PLoS Biol.* *9*, e1001151.
- Ralston, K.J., Hird, S.L., Zhang, X., Scott, J.L., Jin, B., Thorne, R.F., Berndt, M.C., Boyd, A.W., and Burns, G.F. (2004). The LFA-1-associated Molecule PTA-1 (CD226) on T Cells Forms a Dynamic Molecular Complex with Protein 4.1G and Human Discs Large. *J. Biol. Chem.* *279*, 33816–33828.

- Randriamampita, C., Boulla, G., Revy, P., Lemaitre, F., and Trautmann, A. (2003). T cell adhesion lowers the threshold for antigen detection. *Eur. J. Immunol.* *33*, 1215–1223.
- Randriamampita, C., Mouchacca, P., Malissen, B., Marguet, D., Trautmann, A., and Lellouch, A.C. (2008). A Novel ZAP-70 Dependent FRET Based Biosensor Reveals Kinase Activity at both the Immunological Synapse and the Antisynapse. *PLoS ONE* *3*, e1521.
- Ratner, S., Sherrod, W.S., and Lichlyter, D. (1997). Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J. Immunol.* *159*, 1063–1067.
- Real, E., Faure, S., Donnadieu, E., and Delon, J. (2007). Cutting Edge: Atypical PKCs Regulate T Lymphocyte Polarity and Scanning Behavior. *J. Immunol.* *179*, 5649–5652.
- Reichert, P., Reinhardt, R.L., Ingulli, E., and Jenkins, M.K. (2001). Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 4278–4281.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* *2*, 925–931.
- Richie, L.I., Ebert, P.J.R., Wu, L.C., Krummel, M.F., Owen, J.J.T., and Davis, M.M. (2002). Imaging Synapse Formation during Thymocyte Selection: Inability of CD3 ζ to Form a Stable Central Accumulation during Negative Selection. *Immunity* *16*, 595–606.
- Rios, R.M., and Bornens, M. (2003). The Golgi apparatus at the cell centre. *Curr. Opin. Cell Biol.* *15*, 60–66.
- Rodgers, W., and Rose, J.K. (1996). Exclusion of CD45 inhibits activity of p56lck associated with glycolipid-enriched membrane domains. *J. Cell Biol.* *135*, 1515–1523.
- Roumier, A., Olivo-Marin, J.C., Arpin, M., Michel, F., Martin, M., Mangeat, P., Acuto, O., Dautry-Varsat, A., and Alcover, A. (2001). The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity* *15*, 715–728.
- Round, J.L., Tomassian, T., Zhang, M., Patel, V., Schoenberger, S.P., and Miceli, M.C. (2005). Dlg1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J. Exp. Med.* *201*, 419–430.
- Rueda, D., and Thome, M. (2005). Phosphorylation of CARMA1: The Link(er) to NF- κ B Activation. *Immunity* *23*, 551–553.

- Rumi-Masante, J., Rusinga, F.I., Lester, T.E., Dunlap, T.B., Williams, T.D., Dunker, A.K., Weis, D.D., and Creamer, T.P. (2012). Structural Basis for Activation of Calcineurin by Calmodulin. *J. Mol. Biol.* *415*, 307–317.
- Sabatos, C.A., Doh, J., Chakravarti, S., Friedman, R.S., Pandurangi, P.G., Tooley, A.J., and Krummel, M.F. (2008). A Synaptic Basis for Paracrine Interleukin-2 Signaling during Homotypic T Cell Interaction. *Immunity* *29*, 238–248.
- Salmerón, A., Borroto, A., Fresno, M., Crumpton, M.J., Ley, S.C., and Alarcón, B. (1995). Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *154*, 1675–1683.
- Salmon, H., Rivas-Caicedo, A., Asperti-Boursin, F., Lebugle, C., Bourdoncle, P., and Donnadieu, E. (2011). Ex vivo imaging of T cells in murine lymph node slices with widefield and confocal microscopes. *J. Vis. Exp. JoVE* e3054.
- Salter, R.D., Benjamin, R.J., Wesley, P.K., Buxton, S.E., Garrett, T.P.J., Clayberger, C., Krensky, A.M., Norment, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. (1990). A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the $\alpha 3$ domain of HLA-A2. *Nature* *345*, 41–46.
- Samstag, Y., Henning, S.W., Bader, A., and Meuer, S.C. (1992). Dephosphorylation of pp19: a common second signal for human T cell activation mediated through different accessory molecules. *Int. Immunol.* *4*, 1255–1262.
- San José, E., Borroto, A., Niedergang, F., Alcover, A., and Alarcón, B. (2000). Triggering the TCR complex causes the downregulation of nonengaged receptors by a signal transduction-dependent mechanism. *Immunity* *12*, 161–170.
- Sanborn, K.B., Rak, G.D., Maru, S.Y., Demers, K., Difeo, A., Martignetti, J.A., Betts, M.R., Favier, R., Banerjee, P.P., and Orange, J.S. (2009). Myosin IIA associates with NK cell lytic granules to enable their interaction with F-actin and function at the immunological synapse. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6969–6984.
- Sanchez-Madrid, F., and Serrador, J.M. (2009). Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol* *10*, 353–359.
- Sanderson, N.S.R., Puntel, M., Kroeger, K.M., Bondale, N.S., Swerdlow, M., Iranmanesh, N., Yagita, H., Ibrahim, A., Castro, M.G., and Lowenstein, P.R. (2012). Cytotoxic immunological synapses do not restrict the action of interferon- γ to antigenic target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, 7835–7840.

- Saxena, M., Williams, S., Brockdorff, J., Gilman, J., and Mustelin, T. (1999). Inhibition of T Cell Signaling by Mitogen-activated Protein Kinase-targeted Hematopoietic Tyrosine Phosphatase (HePTP). *J. Biol. Chem.* *274*, 11693–11700.
- Schneider, H., Martin, M., Agarraberes, F.A., Yin, L., Rapoport, I., Kirchhausen, T., and Rudd, C.E. (1999). Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *163*, 1868–1879.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int. J. Cancer* *19*, 621–626.
- Sedwick, C.E., Morgan, M.M., Jusino, L., Cannon, J.L., Miller, J., and Burkhardt, J.K. (1999). TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *162*, 1367–1375.
- Serrador, J.M., Cabrero, J.R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A., and Sánchez-Madrid, F. (2004). HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* *20*, 417–428.
- Sherman, E., Barr, V., Manley, S., Patterson, G., Balagopalan, L., Akpan, I., Regan, C.K., Merrill, R.K., Sommers, C.L., Lippincott-Schwartz, J., et al. (2011). Functional Nanoscale Organization of Signaling Molecules Downstream of the T Cell Antigen Receptor. *Immunity* *35*, 705–720.
- Sherman, E., Barr, V., and Samelson, L.E. (2013). Super-resolution characterization of TCR-dependent signaling clusters. *Immunol. Rev.* *251*, 21–35.
- Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O., and Kinashi, T. (2003). Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *J. Cell Biol.* *161*, 417–427.
- Sims, T.N., Soos, T.J., Xenias, H.S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J.M., Waite, J.C., Cameron, T.O., Thomas, V.K., Varma, R., Wiggins, C.H., et al. (2007). Opposing Effects of PKC θ and WASp on Symmetry Breaking and Relocation of the Immunological Synapse. *Cell* *129*, 773–785.
- Singleton, K.L., Roybal, K.T., Sun, Y., Fu, G., Gascoigne, N.R.J., van Oers, N.S.C., and Wulfig, C. (2009). Spatiotemporal Patterning During T Cell Activation Is Highly Diverse. *Sci. Signal.* *2*, ra15–ra15.

- Soares, H., Henriques, R., Sachse, M., Ventimiglia, L., Alonso, M.A., Zimmer, C., Thoulouze, M.-I., and Alcover, A. (2013). Regulated vesicle fusion generates signaling nanoterritories that control T cell activation at the immunological synapse. *J. Exp. Med.* *210*, 2415–2433.
- Sperling, A.I., Sedy, J.R., Manjunath, N., Kupfer, A., Ardman, B., and Burkhardt, J.K. (1998). TCR signaling induces selective exclusion of CD43 from the T cell-antigen-presenting cell contact site. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 6459–6462.
- Spörri, R., and Reis e Sousa, C. (2002). Self peptide/MHC class I complexes have a negligible effect on the response of some CD8⁺ T cells to foreign antigen. *Eur. J. Immunol.* *32*, 3161–3170.
- Stahelin, R.V., Digman, M.A., Medkova, M., Ananthanarayanan, B., Melowic, H.R., Rafter, J.D., and Cho, W. (2005). Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cepsilon: mechanistic differences between protein kinases Cdelta and Cepsilon. *J. Biol. Chem.* *280*, 19784–19793.
- Stahelin, R.V., Kong, K.-F., Raha, S., Tian, W., Melowic, H.R., Ward, K.E., Murray, D., Altman, A., and Cho, W. (2012). Protein kinase Cθ C2 domain is a phosphotyrosine binding module that plays a key role in its activation. *J. Biol. Chem.* *287*, 30518–30528.
- Stefanová, I., Dorfman, J.R., and Germain, R.N. (2002). Self-recognition promotes the foreign antigen sensitivity of naive T lymphocytes. *Nature* *420*, 429–434.
- Stein, J.V., and Nombela-Arrieta, C. (2005). Chemokine control of lymphocyte trafficking: a general overview. *Immunology* *116*, 1–12.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The Immunological Synapse of CTL Contains a Secretory Domain and Membrane Bridges. *Immunity* *15*, 751–761.
- Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* *443*, 462–465.
- Stinchcombe, J.C., Salio, M., Cerundolo, V., Pende, D., Arico, M., and Griffiths, G.M. (2011). Centriole polarisation to the immunological synapse directs secretion from cytolytic cells of both the innate and adaptive immune systems. *BMC Biol.* *9*, 45.
- Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M., and Germain, R.N. (2002). Dynamic Imaging of T Cell-Dendritic Cell Interactions in Lymph Nodes. *Science* *296*, 1873–1876.

- Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J., and Chant, J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 5027–5031.
- Su, I., Dobenecker, M.-W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., and Tarakhovsky, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* *121*, 425–436.
- Sun, Y., Dandekar, R.D., Mao, Y.S., Yin, H.L., and Wülfing, C. (2011). Phosphatidylinositol (4,5) Bispophosphate Controls T Cell Activation by Regulating T Cell Rigidity and Organization. *PLoS ONE* *6*, e27227.
- Sun, Z.J., Kim, K.S., Wagner, G., and Reinherz, E.L. (2001). Mechanisms contributing to T cell receptor signaling and assembly revealed by the solution structure of an ectodomain fragment of the CD3 epsilon gamma heterodimer. *Cell* *105*, 913–923.
- Svensson, L., Howarth, K., McDowall, A., Patzak, I., Evans, R., Ussar, S., Moser, M., Metin, A., Fried, M., Tomlinson, I., et al. (2009). Leukocyte adhesion deficiency-III is caused by mutations in KINDLIN3 affecting integrin activation. *Nat. Med.* *15*, 306–312.
- Tamir, A., Granot, Y., and Isakov, N. (1996). Inhibition of T lymphocyte activation by cAMP is associated with down-regulation of two parallel mitogen-activated protein kinase pathways, the extracellular signal-related kinase and c-Jun N-terminal kinase. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 1514–1522.
- Tavano, R., Contento, R.L., Baranda, S.J., Soligo, M., Tuosto, L., Manes, S., and Viola, A. (2006). CD28 interaction with filamin-A controls lipid raft accumulation at the T-cell immunological synapse. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1270–1276.
- Teft, W.A., Kirchhof, M.G., and Madrenas, J. (2006). A Molecular Perspective of Ctla-4 Function. *Annu. Rev. Immunol.* *24*, 65–97.
- Thauland, T.J., and Parker, D.C. (2010). Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* *131*, 466–472.
- Tibaldi, E.V., Salgia, R., and Reinherz, E.L. (2002). CD2 molecules redistribute to the uropod during T cell scanning: Implications for cellular activation and immune surveillance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 7582–7587.

- Toyoshima, F., Matsumura, S., Morimoto, H., Mitsushima, M., and Nishida, E. (2007). PtdIns(3,4,5)P3 regulates spindle orientation in adherent cells. *Dev. Cell* *13*, 796–811.
- Trautmann, A. (2005). Microclusters initiate and sustain T cell signaling. *Nat. Immunol.* *6*, 1213–1214.
- Trautmann, A., and Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Curr. Opin. Immunol.* *15*, 249–254.
- Trautmann, A., Revy, P., Donnadieu, E., and Bismuth, G. (2003). Synapses immunologiques et synapses neuronales. *Médecine/sciences* *19*, 429–436.
- Underhill, D.M., Bassetti, M., Rudensky, A., and Aderem, A. (1999). Dynamic Interactions of Macrophages with T Cells during Antigen Presentation. *J. Exp. Med.* *190*, 1909–1914.
- Urano, T., Zhang, P., Liu, J., Hao, J.-J., and Zhan, X. (2003). Haematopoietic lineage cell-specific protein 1 (HS1) promotes actin-related protein (Arp) 2/3 complex-mediated actin polymerization. *Biochem. J.* *371*, 485–493.
- Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995a). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide MHC complexes. *Nature* *375*, 148–151.
- Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995b). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J. Exp. Med.* *181*, 577–584.
- Valitutti, S., Müller, S., Dessing, M., and Lanzavecchia, A. (1996). Different responses are elicited in cytotoxic T lymphocytes by different levels of T cell receptor occupancy. *J. Exp. Med.* *183*, 1917–1921.
- Vantourout, P., and Hayday, A. (2013). Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nat. Rev. Immunol.* *13*, 88–100.
- Varma, R., Campi, G., Yokosuka, T., Saito, T., and Dustin, M.L. (2006). T Cell Receptor-Proximal Signals Are Sustained in Peripheral Microclusters and Terminated in the Central Supramolecular Activation Cluster. *Immunity* *25*, 117–127.
- Verstraeten, S.V., Mackenzie, G.G., and Oteiza, P.I. (2010). The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *1798*, 1739–1749.

- Vicente-Manzanares, M., and Sánchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* *4*, 110–122.
- Vig, M., Peinelt, C., Beck, A., Koomoa, D.L., Rabah, D., Koblan-Huberson, M., Kraft, S., Turner, H., Fleig, A., Penner, R., et al. (2006). CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry. *Science* *312*, 1220–1223.
- Viola, A., and Lanzavecchia, A. (1996). T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* *273*, 104–106.
- Viola, A., Schroeder, S., Sakakibara, Y., and Lanzavecchia, A. (1999). T Lymphocyte Costimulation Mediated by Reorganization of Membrane Microdomains. *Science* *283*, 680–682.
- Vyas, Y.M., Mehta, K.M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J.K., and Dupont, B. (2001). Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 4358–4367.
- Wang, H., Moon, E.-Y., Azouz, A., Wu, X., Smith, A., Schneider, H., Hogg, N., and Rudd, C.E. (2003). SKAP-55 regulates integrin adhesion and formation of T cell-APC conjugates. *Nat. Immunol.* *4*, 366–374.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. (1995). Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science* *270*, 985–988.
- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr. Biol. CB* *11*, 370–374.
- Weiss, A., and Imboden, J.B. (1987). Cell surface molecules and early events involved in human T lymphocyte activation. *Adv. Immunol.* *41*, 1–38.
- Whitmarsh, A.J., and Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *74*, 589–607.
- Wiedemann, A., Depoil, D., Faroudi, M., and Valitutti, S. (2006). Cytotoxic T lymphocytes kill multiple targets simultaneously via spatiotemporal uncoupling of lytic and stimulatory synapses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *103*, 10985–10990.

- Williamson, D.J., Owen, D.M., Rossy, J., Magenau, A., Wehrmann, M., Gooding, J.J., and Gaus, K. (2011). Pre-existing clusters of the adaptor Lat do not participate in early T cell signaling events. *Nat. Immunol.* *12*, 655–662.
- Xavier, R., Brennan, T., Li, Q., McCormack, C., and Seed, B. (1998). Membrane Compartmentation Is Required for Efficient T Cell Activation. *Immunity* *8*, 723–732.
- Xavier, R., Rabizadeh, S., Ishiguro, K., Andre, N., Ortiz, J.B., Wachtel, H., Morris, D.G., Lopez-Illasaca, M., Shaw, A.C., Swat, W., et al. (2004). Discs large (Dlg1) complexes in lymphocyte activation. *J. Cell Biol.* *166*, 173–178.
- Xu, C., Gagnon, E., Call, M.E., Schnell, J.R., Schwieters, C.D., Carman, C.V., Chou, J.J., and Wuchterpfennig, K.W. (2008). Regulation of T cell receptor activation by dynamic membrane binding of the CD3epsilon cytoplasmic tyrosine-based motif. *Cell* *135*, 702–713.
- Yi, J., Wu, X.S., Crites, T., and Hammer, J.A., 3rd (2012). Actin retrograde flow and actomyosin II arc contraction drive receptor cluster dynamics at the immunological synapse in Jurkat T cells. *Mol. Biol. Cell* *23*, 834–852.
- Yi, J., Wu, X., Chung, A.H., Chen, J.K., Kapoor, T.M., and Hammer, J.A. (2013). Centrosome repositioning in T cells is biphasic and driven by microtubule end-on capture-shrinkage. *J. Cell Biol.* *202*, 779–792.
- Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* *6*, 1253–1262.
- Yonemura, S., Hirao, M., Doi, Y., Takahashi, N., Kondo, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1998). Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J. Cell Biol.* *140*, 885–895.
- Zal, T., Zal, M.A., and Gascoigne, N.R.J. (2002). Inhibition of T cell receptor-coreceptor interactions by antagonist ligands visualized by live FRET imaging of the T-hybridoma immunological synapse. *Immunity* *16*, 521–534.
- Zanin-Zhorov, A., Ding, Y., Kumari, S., Attur, M., Hippen, K.L., Brown, M., Blazar, B.R., Abramson, S.B., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2010). Protein Kinase C- θ Mediates Negative Feedback on Regulatory T Cell Function. *Science* *328*, 372–376.

- Zech, T., Ejsing, C.S., Gaus, K., de Wet, B., Shevchenko, A., Simons, K., and Harder, T. (2009). Accumulation of raft lipids in T-cell plasma membrane domains engaged in TCR signalling. *EMBO J.* 28, 466–476.
- Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J.K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 171, 1360–1368.
- Zhu, J., Burakov, A., Rodionov, V., and Mogilner, A. (2010). Finding the Cell Center by a Balance of Dynein and Myosin Pulling and Microtubule Pushing: A Computational Study. *Mol. Biol. Cell* 21, 4418–4427.
- Zipfel, P.A., Bunnell, S.C., Witherow, D.S., Gu, J.J., Chislock, E.M., Ring, C., and Pendergast, A.M. (2006). Role for the Abi/wave protein complex in T cell receptor-mediated proliferation and cytoskeletal remodeling. *Curr. Biol. CB* 16, 35–46.
- Zúñiga, L.A., Jain, R., Haines, C., and Cua, D.J. (2013). Th17 cell development: from the cradle to the grave. *Immunol. Rev.* 252, 78–88.
- Zyss, D., Ebrahimi, H., and Gergely, F. (2011). Casein kinase I delta controls centrosome positioning during T cell activation. *J. Cell Biol.* 195, 781–797.

ANNEXES

I. **ARTICLE 1 (EN COURS DE SOUMISSION) : T CELL ADHESION TO ANTIGEN-
PRESENTING CELLS TRIGGERS THE FORMATION OF THE ANTISYNAPSE, A
SIGNALING POLE OPPOSITE THE IMMUNE SYNAPSE.**

T cell adhesion to antigen-presenting cells
triggers the formation of the antisynapse,
a signaling pole opposite the immune synapse

Chloé Guedj^{1,2,3}, Nicolas Abraham^{1,2,3}, Damien Jullié^{1,2,3,4} & Clotilde Randriamampita^{1,2,3}

¹INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France

²CNRS, UMR8104, Paris, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, France.

22 rue Méchain, 75014 Paris, France

⁴Present address: UCSF, School of Medicine, Dpt of Psychiatry, CA 94158, San Francisco, USA

Correspondence: clotilde.randriamampita@inserm.fr

Running title: Antisynapse, a new signaling pole in T lymphocytes

Abstract

Lymphocyte activation is initiated by the T cell recognition of foreign antigens presented by an antigen-presenting cell. This event triggers a signaling cascade supposed to be located at the immunological synapse, the interface between the two cells. Here we show that before a conspicuous synapse is formed, a signaling pole can be detected at the opposite pole of the T cell, which we called antisynapse. This structure is early and transient and contains all the components classically described at the immunological synapse. Its formation is independent of a TCR-induced signaling cascade but is driven by adhesion. Our experiments suggest that the antisynapse constitutes a reservoir of signaling molecules ready to be sent to the synapse through a microtubule-dependent pathway. It can thus be considered as a pre-synapse triggered independently of antigen recognition.

Introduction

T cell activation is triggered by the recognition by a T lymphocyte of a cognate antigen at the surface of an antigen presenting cell (APC). One of the first events triggered thereafter is usually considered to be the establishment of the immune synapse (IS), named by analogy with the neural synapse (Norcross, 1984; Paul and Seder, 1994; Grakoui et al., 1999). The immune synapse functions as a local platform of signaling molecules, organized into signaling complexes called signalosomes, able to receive and transduce the activation signal. This structure permits the stabilization of the contact and allows a local secretion of cytokines (Chemin et al., 2012; Huse et al., 2006) as well as the polarization of cytolytic granules close to the target cell (Stinchcombe et al., 2001). Simultaneously, the microtubule organizing center (MTOC) relocates to the IS (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1987). Although, IS was initially reported to form after antigen recognition, antigen-independent contact can also trigger the formation of such a structure (Revy et al., 2001). More recently, the sole activation of LFA-1 upon T cell contact to APC was shown to already promote the establishment of T cell polarity preparing the T cell to antigen recognition (Contento et al., 2010) comforting the fact that T cell adhesion *per se* can prime the subsequent TCR response (Conche et al., 2009).

Although the global structure of the IS may vary depending on the nature of the lymphocyte and the APC (Thauland and Parker, 2010; Trautmann and Valitutti, 2003), its composition is now well established and its elementary units are considered to be microclusters organized around the TCR (Campi et al., 2005). By using a ZAP-70 reporter, we recently made the unexpected observation that T/APC contacts trigger an increase in activity of the tyrosine kinase ZAP-70 not only at the IS but also at the opposite pole, which we called the antisynapse (Randriamampita et al., 2008). Here, we show that this structure is very frequent, has a composition similar to that of the IS, precedes the IS

itself and is triggered by T/APC contact without requiring TCR engagement. Our results show that signaling complexes, similar to synaptic signalosomes can self-organize at the antisynapse independently of TCR and CD3 and that they constitute a reservoir of signaling molecules for the synapse.

Results

Accumulation of signaling molecules at the antisynapse

Considering that activated ZAP-70 can be observed at the antisynapse (Randriamampita et al., 2008), we looked at the distribution of other molecules involved in early TCR signaling. As depicted in Figure 1, an antisynaptic accumulation can be observed for Lck, PLC γ , PI3K and LAT. Furthermore, just like the synapse, the antisynapse corresponds to a region enriched in lipid rafts, as attested by the recruitment of the short peptide mLck composed to the first 13 amino acids of Lck that anchor this protein into the rafts. An enrichment of PIP $_2$ can also be observed at the antisynapse, as well as at the synapse (Figure S1A). We also found an antisynaptic accumulation of phosphotyrosine (Figure 1a) and phosphoERK labelling (Figure S1A), unraveling that kinases recruited at this site are active. This confirms and extends the seminal results that we obtained with the probe ROZA (Randriamampita et al., 2008). Antisynaptic structures could be observed not only in Jurkat/Raji B cells conjugates (Figure 1A) but also with primary cells. Indeed, contacts between purified human T cell and dendritic cell (DC) also triggered antisynapse formation even in the absence of exogenous antigen (Figure 1B). Such a structure could also be detected *in situ* in murine lymph node slices in conjugates formed between T cells and either B cells or DCs (Figure 1C). Interestingly, a majority of antisynapses showing a P-Tyr accumulation also present a clustering of the adaptor LAT. Similarly, mLck antisynapses also possess LAT. These results were reinforced by proximity ligation assays. This technique reveals the proximity of molecules that are less than 40 nm apart and thus, potentially interacting with each other. As shown in Figure S1B, a positive signal could be observed for the couples LAT/Lck and LAT/PLC. Altogether, these results suggest that the antisynapse corresponds to a signaling complex that resembles the classical signalosome observed at the synapse.

The distal pole complex (DPC) is a structure which has also been reported at the pole that is opposite to the synapse (Cullinan et al., 2002). However, unlike the antisynapse, the DPC consists in a distinct accumulation of negatively signaling molecules which, in certain conditions, could be kept away from the synapse. This is the case for instance of CD43, a key marker of DPC, which does not accumulate at the antisynapse (Figure S1C).

Antisynapses are frequently associated with a cell deformation (Figure 1 and followings, white arrows) looking like a bud or a cilium. Indeed, $78 \pm 4\%$ of antisynapses ($n=4$ independent experiments, 13-33 conjugates/experiment) showed such membrane protrusions. This deformation clearly forms after the contact, simultaneously with the antisynapse, and therefore does not correspond to a remaining uropod. Associated with the accumulation of signaling molecules, we observed a clear increase of F-actin at the same location (Figure 1A, Figure S2).

The observations on fixed conjugates were completed by live imaging experiments which permit to follow as a function of time the distribution of a tagged protein expressed in the T cell. Such an experiment is presented in Figure 1D, where the frequency of antisynapses was quantified in "productive" conjugates, i.e. those that also lead to the formation of synapses. One can see that in a large majority of these conjugates, different tagged proteins accumulate at the antisynapse with similar frequencies (around 80%), with the noticeable exception of CD3 that accumulates at the antisynapse only in 30% of the productive conjugates. Altogether, these results show that the antisynapse is a very frequent structure that contains all the signalosome components classically reported at the synapse, and which accumulation and assembly at the antisynapse is often independent of the presence of CD3.

Antisynapse kinetics

In order to determine the kinetics of antisynapse, we performed experiments on conjugates which had been synchronized by centrifugating T cells expressing mLck and APC. As shown in Figure 2A, the antisynapse is a transient structure, since in a few minutes, the occurrence of mLck rapidly decreased at the antisynapse but stabilized at the synapse. Note however that the kinetics of formation of this structure is too fast to be measurable with this approach. Therefore, we switched to live imaging experiments (Figure 2B-C). Intracellular calcium (Ca) measurements were used to witness T cell activation, simultaneously with mLck movements. In the experiment illustrated in Figure 2B, T/APC contact triggers a rapid Ca rise and a mLck clustering first at the antisynapse, and, one minute later, at the synapse. Thereafter, the antisynapse vanished and the intensity at the synapse became brighter. These events were quantified by measuring the intensity of the marker in the two areas (the synapse and the antisynapse) with time. One can see that the presence of the marker at the antisynapse is an early and transient event, whereas its synaptic clustering is delayed and sustained. The kinetics of synapse and antisynapse distributions were pooled for a series of conjugates and we measured the delay from the beginning of the contact (based on transmitted light movies, as the time of the first physical contact between the T cell with the APC) (Figure 3C). Although antisynapses could be detected within less than one minute after the T cell touched the APC, slightly before the Ca, synapses appeared statistically later. Thus, antisynapse are transient structures with life times of ~ 5 minutes.

What is the fate of antisynapses?

We next examined what could happen to the components of the antisynaptic signaling complex, after its disappearance. To tackle this question, we made use of T cells expressing a antisynaptic/synaptic marker (here Lck) coupled to the photoswitchable fluorescent tag Dendra-2 (Chudakov et al., 2007). As shown in Figure 3A, after a

short UV laser illumination focused at the antisynapse (blue spot), Dendra-2 molecules switched from green to red emission (yellow arrow on the second row). Thereafter, an accumulation of red molecules could be detected at the synapse in a matter of seconds (yellow arrow on the third row), unraveling an efficient transfer of signaling molecules from the antisynapse to the synapse. Finally, all photoconverted molecules accumulate at the synaptic level. This phenomenon is quantified in Figure 3B. This kind of experiment permits to directly follow the relocalization of antisynapse components to the synapse and would theoretically be the best way to study the antisynapse fate. However it is technically quite tricky, and cannot be performed routinely.

We thus chose to address the question of antisynapse fate by looking statistically at late time point (>7 minutes) conjugates. As expected, at that time, the frequency of antisynapses is very low (Figure 3C black bars). However, we observed that when microtubule polymerization was blocked by nocodazole, a high frequency of antisynapses could still be observed even in 20 minutes contacts (Figure 3C gray bars). This result suggests that nocodazole permit the stabilization of antisynaptic components at this pole.

Altogether, these results show that at least a fraction of the molecules involved in the antisynaptic signaling complex are transferred to the synapse, and that the switch from an antisynaptic to a synaptic structure relies on a microtubule-dependent pathway.

The disappearance of antisynapse takes place simultaneously with MTOC relocalization.

In migrating T cells, the centrosome or MTOC is usually located at the rear of the cell. However, it is well-established that rapidly after the T-APC contact, the T cell MTOC moves towards the IS. As this relocalization happens in the same time frame as the antisynapse, both events were monitored simultaneously during conjugate formation, MTOC being labelled by centrin and antisynapse by mLck (Figure 4A). MTOC relocalization was quantified as the distance between the centrin and the IS (Figure 4A). It appears clearly that the MTOC started to move (decrease of the MTOC/IS distance) when the antisynapse was fully formed. Then, after a short delay, the antisynapse started to fade. This result is confirmed on Figure 4B where, in the same series of synchronized conjugates as the one presented in Figure 2A, the position of MTOC was simultaneously analyzed: in the minutes following conjugate formation, the frequency of antisynapses is inversely correlated with that of relocalized MTOC. Thus, synaptic MTOC movement and antisynapse disappearance are two temporally linked events.

What controls antisynapse formation?

What triggers antisynapse formation? A putative role of cytoskeleton was first examined. As shown in Figure 3C, blockade of microtubule dynamics does not prevent antisynapse formation. Next, we attempted to test if latrunculin,

an inhibitor of cortical actin polymerization, could affect antisynapse formation. Unfortunately, at 500 nM, the concentration required for actin depolymerization as checked by phalloidin labeling, the formation of T/APC conjugates was abolished, an observation consistent with a previous report (Delon et al., 1998). At a lower concentration (10 nM), conjugates could form normally and antisynapses observed, however the effect on actin was weak (Figure S2). It was therefore impossible to draw a conclusion concerning the role of the actin network on antisynapse formation.

Although a Ca rise could be detected in most cases *after* antisynapse formation (Figure 2C), one could imagine that a local and/or tiny, undetectable Ca increase could be involved in triggering antisynapse formation. To rule out this possibility, the antisynapse frequency has been evaluated under conditions where the Ca rise was blunted by intracellular BAPTA, as attested by the blocking of the anti-CD3-induced Ca rise (Figure S3A). For three markers of antisynapse (PLC γ , mLck and phosphotyrosine), no significative difference in their antisynaptic accumulation was observed between BAPTA and control conditions (Figure S3B).

The importance of the strength of the TCR-induced signal was then investigated. Unexpectedly, the frequency of antisynapses remained practically constant when the superantigen (SAg) concentration was decreased (Figure S3C). This finding is strengthened by analyzing conjugates formed between human DCs and autologous primary T cells in the presence or absence of exogenous antigen. Indeed, the frequency of antisynapses observed in absence of antigen was 125 ± 25 % of that observed in the presence of SAg (100 ng/ml) (n=2 independent experiments, 35-52 conjugates/condition). This result suggests that antisynapse formation might be independent of TCR signaling.

Triggering of antisynapse formation is independent on TCR signaling

To further test this hypothesis, we examined the role of Lck activation, one of the earliest events occurring TCR activation. After inhibition of Lck with the Scr inhibitor PP2 and checking the efficiency of PP2 on anti-CD3-induced Ca rise and tyrosine phosphorylation (Figures S3A & S3D), a normal frequency of antisynapse was observed, as judged by LAT or mLck distributions (Figure 5A).

Next we examined if even the presence of TCR was dispensable for antisynapse induction, which was already suggested by the existence of antisynapses without detectable CD3 clustering (see Figure 1D). Although antisynapses can be observed in the absence of exogenous antigen, one cannot exclude the possibility that MHCII molecules loaded with endogenous self-antigen on APC could elicit some signal in T cells. To rule out this possibility, we used TCR-deficient Jurkat T cells (JRT3 (Schneider et al., 1977) and J31.13 (Alcover et al., 1990)) and compared the frequency of antisynapses after conjugate formation. JRT3 and J31-13 are T cells deficient in the β chain of the TCR. As a result, they express neither TCR nor CD3 at their surface and do not display a CD3-induced Ca responses

compared to the large ones observed in E6.1 Jurkat cells (Figures S4A & S4B). As shown in Figure 5B for 3 minute contacts, the frequency of antisynapses was not significantly reduced in TCR-deficient cells. To rule out potential differences due to the fact that TCR-deficient cells make looser contacts with APC, we restricted the analysis to conjugates with contacts tight enough to induce Pyk-2 activation at the interface (Figures 5B & 5C). Pyk-2 is indeed a tyrosine kinase activated by adhesion especially in T cells (Doucey et al., 2003). With this restriction, antisynapse frequencies were even slightly higher in TCR-deficient cells. This confirms that activation of the signaling pathway downstream of TCR is not necessary for antisynapse formation.

Antisynapse formation can be triggered by adhesion

Next, we examined if T cell adhesion could constitute the triggering event for antisynapse formation. To this end, we tested the capacity of antibody-coated beads to induce antisynapse after contact with T cells. These beads were coated with anti-CD3/antiCD28 as a control or with antibodies directed against adhesion molecules (a chain of LFA1 (CD11a) or ICAM-1 (CD54)). Two kinds of antibodies directed against LFA1 have been used: a neutralizing one and a second one able to switch LFA1 into its high affinity conformation. Beads coated with any of these antibodies were able to trigger the formation of antisynapses in Jurkat T cells or PBT as efficiently as beads coated with antiCD3/CD28 (Figures 5D & 5E respectively). Interestingly, beads coated with antibodies directed against the non-signaling molecule MHC I, were also able to induce antisynapses (Figure 5E). These results demonstrate that the key event for triggering antisynapse formation is T cell adhesion and not TCR-induced signaling.

Discussion

Our results have revealed the existence of a new structure, the antisynapse, located at the pole opposite to that of the immune synapse. It contains all the components classically described at the IS and constitutes a real signaling complex as attested by tyrosine phosphorylation. Accumulation of some molecules at the rear of the cell have already been reported in the case of uropod (LAT for instance (Azar et al., 2010)) and of DPC (Barr et al., 2008; Cullinan et al., 2002). However antisynapse is different from these structures. Indeed, by live imaging experiments (see for instance Figure 2C), we have clearly shown that the antisynapse forms *after* the T-APC contact, and is therefore not a remaining structure from the uropod. The kinetics and the composition of the antisynapse are also clearly different from those of the DPC, which is a late structure that accumulates inhibitory molecules. Therefore, it seems more appropriate to call this structure antisynapse and thus avoid confusion with the distal pole.

By its composition, the antisynapse shares a number of features with the synapse, even if it is located exactly at its antipode. Similar unexpected distributions can be found in former reports of T/APC contacts, but they were usually not analyzed nor even mentioned (Brossard et al., 2005; Costello et al., 2002; DeFord-Watts et al., 2011; Deford-Watts et al., 2009; Holdorf et al., 2002; Le Floc'h et al., 2013; Revy et al., 2001). A spatiotemporal analysis of 30 signaling sensors patterning has also been performed, identifying the distal pole as a place where several of these sensors accumulate (Singleton et al., 2009). However, this pole has not been analyzed as a structure, with clear spatio-temporal features. More recently, a multimolecular analysis of 25 signaling molecules distribution during T/APC contacts has been performed, revealing the existence of sequential signaling clusters; unfortunately it was focused on the synapse with no analysis of the initial 5 minutes (Philipsen et al., 2013).

We have clearly shown that antisynapse formation is a physiological event, independent of cognate antigen presentation and recognition, as it was observed with TCR deficient T cells as well as with human T cells and autologous DCs, *in situ* in lymph node slices. We propose that the formation of this structure is triggered by T cell adhesion. This hypothesis is further strengthened by results showing that in TCR-deficient cells, contacts that are strong enough to trigger Pyk2 activation are more susceptible to induce an antisynapse than those that do not lead to Pyk2 activation. In the past few years, several studies have shown that a T/APC contact, involving integrins or not, facilitated TCR signaling. Indeed, Contento et al have shown that the adhesive signal delivered by LFA-1 (turned into its high affinity form thanks to chemokine-dependent signaling) was sufficient to induce IS formation, whereas the TCR signal was important for synapse stabilization and a sustained activation (Contento et al., 2010). Furthermore, we have recently reported that T cell adhesion was able to prime the T cell response, whether or not integrins were involved (Conche et al., 2009). Finally, T cells have been shown to be able to sense the rigidity of the

object with which they interacted. This rigidity was able to modulate TCR signaling (Judokusumo et al., 2012). We have shown here that beads covered with several different types of antibodies can efficiently induce antisynapse formation, confirming that the initial signal is not necessarily integrin-dependent, but rather that multiple adhesion signals can converge for triggering this phenomenon.

What can then be the nature of this initial signal? The first possibility is that adhesion generates a signaling cascade able to trigger antisynapse formation. We have excluded the involvement of a Ca rise in such a cascade. We have recently shown that a very early transient increase in cAMP was triggered in T lymphocyte after contact with an APC (Conche et al., 2009). This cAMP transient could constitute a good candidate for adhesion-induced antisynapse formation, although we have no evidence for a cAMP wave moving from the place of the initial contact to the opposite cell pole. Another interesting possibility is that antisynapse formation is triggered by the physical constraint and the subsequent change in membrane tension induced by the deformation at the contact zone. Relaxation of the T cell membrane has indeed been observed locally at the T/APC interface (Faure et al., 2004). Such a change in membrane tension can in itself constitute a signal: recently, in migrating neutrophils, Houck et al have elegantly demonstrated that this relaxation, taking place at the leading edge, drives a long-range signal able to inhibit the formation of extra leading edges (Houk et al., 2012). To test this tension hypothesis, we have compared the antisynapse formation elicited by antibody-coated flat surfaces versus antibody-coated beads, two settings likely to induce different changes in membrane tension. We have observed that adhesion to surfaces coated with anti-LFA1 or even with antiCD3/CD28 could hardly induce any antisynapse formation (data not shown), suggesting that the geometry of the contact is important for this event.

The location of the antisynapse, at the antipode of the initial signal, is surprising. Interestingly, it has recently been shown that membrane fluidity and composition can be rapidly and transiently modified in response to a global mechanical stress (Verstraeten et al., 2010). Because aggregation of rafts into discrete spots has been especially observed in this configuration, one can wonder what would be their distribution in the case of a local mechanical stress as it may happen upon T/APC conjugation. Could a local mechanical pressure induce raft clustering at the opposite pole? If so, the assembly of rafts at this pole might drive the relocalization of a series of raft anchored proteins and of their partners as observed at the antisynapse.

Recently, an actin-rich bud has been shown to form rapidly at the apical surface of several cell types after their attachment on substrates (Galvagni et al., 2012). This structure resembles the one that frequently appeared, simultaneously with the antisynapse, after T cell contact with an APC. Since this transient structure has been shown to play an important role of polarity organizer in epithelial cells, one can wonder whether the antisynapse could similarly contribute to establish a polarization axis after contact. Such a possibility would be consistent with the link

that we have established between antisynapse kinetics and MTOC relocalization. The initial eccentric positioning of the MTOC at the rear of migrating cells corresponds to its minimum energy position (Maly, 2011). Its relocalization shows that a symmetry breaking happens after the contact. The mechanism leading to this movement might be triggered by specific local enzymatic activities present at the antisynapse, and/or by the local morphological deformation associated with a change in cytoskeleton organization.

Our results demonstrate that the antisynapse is a transient structure. What is the importance of this feature relative to T cell activation? Recently, PIP₂, an actin-interacting phospholipid able to regulate membrane rigidity, has been shown to accumulate at the opposite pole of the T/APC synapse simultaneously with TCRz (Sun et al., 2011). Interestingly, the authors observed that increasing or stabilizing the accumulation of PIP₂ at this position through overexpression of specific isoforms of PIP5K, induced a stabilization of TCRz at this point, and a reduction of LAT and PLCg phosphorylation at the synapse, and of IL2 production. These results suggest that a decrease of this phospholipid, expected to cause some membrane relaxation at the antisynapse, is required for the migration of its components to the synapse and therefore for an optimal T cell activation. Our study identifies microtubules as another dynamic structure involved in antisynapse stabilization. Interestingly, inhibition of this structure has also been reported to limit T cell activation (Delon et al., 1998). Altogether, these results suggest that, whether associated with PIP₂ or microtubule dynamics, the antisynapse-associated signaling complex must be transient for an optimal TCR signaling.

A last question concerns the fate of antisynapse components in the absence of a productive contact. As reviewed in (Gerard et al., 2013), T cell activation results from a series of primary contacts, the stability of which depending on the strength of the triggering signal. We make the hypothesis that even short-lasting contacts (Dustin, 2008; Moreau et al., 2012) could induce antisynapses. Once transient conjugates are disrupted, the antisynapse components could stay as nanoclusters (Alarcon et al., 2011), ready to coalesce again into microclusters for the next conjugate. In such a hypothesis, antisynapses would contribute to the integration of TCR signals. Such putative nanoclusters could also be generated by self-recognition and underlie the tonic signaling phenomenon (Garbi et al., 2010).

More generally, it is usually considered that TCR signaling starts in a signalosome centered around TCR molecules clustered at the IS. Our findings challenge this point of view. Indeed, the features of the antisynapse reveal the existence of self-assembly mechanisms that allow the formation of signaling complexes, not necessarily centered on the TCR, and not necessarily at the synapse. The ability to form such pre-signalosomes is likely to contribute to the exquisite sensitivity of antigen detection in T-APC conjugates.

In conclusion, the antisynapse is a transient multimolecular complex formed very early upon T-APC contact. Since, soon after being formed, its components migrate to the synapse, it can be viewed as a reservoir of signaling molecules for the synapse, and could be considered as a pre-synapse.

Experimental Procedures

Cells

Jurkat T cells (J77 clone 20) and Raji B cells were kind gifts of G. Bismuth (Institut Cochin, Paris, France) and J31.13 of O. Acuto (Oxford University) and JRT3 of J. Dechanet Merville (Segalen University, Bordeaux). They were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 2mM L-Glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin.

Human T lymphocytes (PBT) and monocytes were isolated from healthy blood donors (Etablissement Français du Sang, Paris, France) by Ficoll density gradient centrifugation, followed by negative selection for T cells (Human T-cell isolation kit, EasySep) and CD14 positive selection (CD14 MicroBeads, Miltenyi Biotec) for monocytes. PBT were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10% AB serum, 2mM L-Glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Monocytes were differentiated in RPMI 1640 supplemented with 10% FCS, 50 ng/ml GM-CSF and 40 ng/ml IL4. After 6 days, immature DC were elutriated and matured overnight with 10ng/ml LPS.

Mice

C57BL/6J mice were purchased from Charles River laboratories. Animal care was performed by expert technicians in compliance with relevant law and institutional guidelines.

Antibodies and reagents

Superantigen (SAg) was a mix of recombinant staphylococcal enterotoxin E, staphylococcal enterotoxin A, staphylococcal enterotoxin B, and staphylococcal enterotoxin C3 (Toxin Technology).

Human cells were stained with antibodies against CD3-ζ (sc20919, Santa Cruz), CD4-Alexa Fluor 647 (557707, BD), CD43 (555474, BD), LAT (sc7948, Santa Cruz); Lck (sc433, Santa Cruz) (sc13, Santa Cruz), PKCθ (sc212, Santa Cruz), PLCγ1 (sc7290, Santa Cruz)(sc81, Santa Cruz), Pericentrin (ab4448, Abcam), Phospho Tyr402 Pyk2 (44618, Invitrogen), phospho-Tyr418-Src (44660, Invitrogen), Alpha-Tubulin (T9026, Sigma), Phospho-ERK (Sigma), PIP₂ (PerSeptive Biosystems), Phospho-Tyrosine (9411, Cell Signaling). Alexa-Fluor-647, Alexa-Fluor-568 and Alexa-Fluor-488 Donkey anti Mouse and Alexa-Fluor-647, Alexa-Fluor-568 and Alexa-Fluor-488 Donkey-anti-Rabbit (Invitrogen) were used as secondary antibodies. T cells were stimulated with anti CD3-ζ (550367, BD) when specified. Murine cells were stained with antibodies against B220-Alexa Fluor 647 (557683, BD), CD3ε-PE (12-0033, eBioscience). Beads were coated with antibodies against CD11a (ab3981, Abcam) to lock LFA-1 to the high affinity conformation, CD11a (217640, Calbiochem) to lock LFA-1 to the low affinity conformation, CD18 (555922, BD), CD54 (559047, BD), CD3 (555329, BD), CD28 (555725, BD). Actin was stained with Phalloidin-Alexa Fluor 594

(A12381, Invitrogen). Nuclear staining was realized with 1 µg/mL Hoechst 33258 (Sigma). The Src inhibitor PP2 (529576, Calbiochem) was used at 10µM. Latrunculin A (Alexis, Biochemical) was used at 10 nM and 500 nM. Nocodazole (487928, Calbiochem) was used at 10 µM.

Constructs

P85-YFP (pEYFP-C1), Akt-PH-YFP (pEYFP-C1) and CD3-YFP (pEYFP-C1) were provided by Georges Bismuth. mLck YFP was obtained from mLck-GFP (provided by Anne-Marie Lellouch, INSERM U1067, Marseille, France) and pEYFP-C1 (Clontech). HsCentrin1-CFP (pECFP-C1) was obtained from HsCentrin1-GFP (pEGFP-C1) plasmid provided from Annie Delouée (Curie institute, Paris, France). Lck-Dendra2 (pDendra2-N) was created from the pDendra2-N plasmid (Clontech) and the Lck fragment amplified from the Lck-GFP (pECFP-N1) plasmid (from Vincent Feuillet, Cochin institute, Paris, France). Validation of the constructs was performed by restriction digestion analyses and DNA sequencing of the insert. Sequencing was performed by Eurofins (mwg/operons) (Paris, France).

Transfection

Jurkat cells were transiently transfected by electroporation (Biorad system with the settings of 270 V and 950 µF) in serum free culture medium with 5 µg of ADN constructs for 5M of cells. PBT were transiently transfected by nucleofection (Amaxa Nucleofector, Lonza) in human T cell solution (Lonza) with 5µg of ADN constructs for 5M of cells with U014 program. Electroporated and nucleofected cells were used 24h after electroporation

Conjugates in fixed and live experiments

Fixed Raji-Jurkat or mDC-T cell conjugates: For Raji-Jurkat, cells were mixed in 1:2 ratio and mDC-T cell in 0.7:1 ratio. Raji cells or DCs were incubated with 200 ng/ml superantigen in serum-free RPMI on coverslips for 30 min at 37°C except when specifically specified. When indicated, T cells were incubated with nocodazole, latrunculin or PP2 in serum-free medium for 30 min at 37°C. Except for PP2 which is highly reversible, T cells were rinsed and deposited on APCs. Conjugates were fixed at different time points in 4 % paraformaldehyde for 10 minutes. For synchronized conjugates, Raji and Jurkat cells were mixed in 1:1 ratio by centrifugation in a tube. Conjugates were fixed then rinsed 3 times in PBS, 0.5% BSA. They were then laid on coated with Poly-L-Lysine (P8920, Sigma Aldrich) coverslips for 1 hour before staining.

Raji-Jurkat live conjugates: Raji cells were incubated in a 35 mm glass bottom dish for 30 min in serum-free RPMI with SAg at 200 ng/ml at 37°C. T cells were loaded with 0.5µM Fura-2/AM for 20min. After washing the Raji cells, the

dish was placed under the objective lens and T cells were added. Experiments were performed at 37°C in mammalian saline (140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 20mM HEPES, 11mM glucose).

Beads-T-cell conjugates: 4.5µm beads (Dynabeads Pan Mouse IgG, 110.41, Invitrogen) were coated following the manufacturer's instructions, then deposited on coverslips. The coverslips were placed above a parafilm coated magnet until the end of staining to avoid the loss of beads during washes. T cells were deposited and conjugates were fixed at different time points in 4 % paraformaldehyde for 10 minutes.

Lymph nodes slices

Inguinal lymph nodes were isolated from a C57Bl/6J mouse then fixed in Periodate-Lysin-Paraformaldehyde fixative solution for 3 hours. Lymph Nodes slices were prepared as described previously (Asperti-Boursin et al., 2007; Salmon et al., 2011). In brief, samples were embedded in 5% low-gelling-temperature agarose (type VII-A; Sigma-Aldrich) prepared in PBS. 250 µm slices were cut with a vibratome (VT 1000S; Leica) in PBS.

Immunofluorescence Staining

Fixed conjugates: staining and permeabilization were performed in PBS, 0.5% BSA, 0.1% Saponin. Primary and secondary antibodies were incubated 30 min at room temperature (RT). Hoechst and Phalloidin were incubated for 15 min. Three washes in the same buffer were done between all these steps. At the end, coverslips were washed in PBS then mounted in FluorSave reagent (Merck Millipore) on a slide.

Slices: Slices were transferred to 0.4 µm organotypic culture inserts (Millicell; Millipore) in a 6-well plate containing 1 ml PBS. Stainless steel washers with inner diameter of 4 mm were placed on each individual slice. Intracellular primary antibodies were mixed in 20µl PBS and deposited in the inner part of the washer for 15 min at RT. After rinsing, secondary intracellular staining was realized in the same buffer for 15 min at RT. The slices were then washed once in the same buffer and then in PBS.

At the end, the washers were removed and slices deposited (stained side on the top) on a slide with a drop of PBS and covered with a 24 x 50 mm coverslip.

Proximity Ligation Assays: these experiments were performed following the manufacturer's instructions of the Duolink II kit (92007-003, Olink Bioscience).

Flow Cytometry: Cells were fixed for 10 min in 4% paraformaldehyde in PBS at RT. Primary and secondary antibodies were incubated for 30 min at RT with cells in 0.5% BSA PBS.

Flow Cytometry

Experiments were performed with a BD FACSCalibur (BD Biosciences). Acquisition was done with the CellQuest Pro software (BD). Data files were analyzed using FlowJo software.

Calcium measurements in cuvette

For testing the BAPTA and PP2 efficiency, T cells were incubated for 20 min at 37°C with 1.5 μ M Fura-2/AM (MolecularProbes). Measurements were performed in mammalian saline by spectrofluorimetry as previously described (Randriamampita et al., 2003) with a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian) (excitation: 340 and 380 nm; emission: 510 nm). Cells were stimulated with 5 μ g/ml anti-CD3.

Imaging

Fixed conjugates were imaged using an inverted microscope DMI6000 (Leica) equipped with a spinning disk head (Yokogawa CSU-X1M1), 60x/NA:1.4 and 40x/NA:1.4 objectives and a CoolSnap HQ2 camera (Photometrics) (pixels of 6.45 μ m). Live experiments were performed at 37°C with an inverted wide field microscope (Nikon TE300) using Plan Apo 60x/1.4 and S Fluor 40x/1.3 objectives and a Cascade 1K camera (Photometrics) with a pixel size of 8 μ m. Photo-conversion experiments were performed using an inverted wide field microscope iMic (TILL Photonics) equipped with a scanner Yanus IV (TILL Photonics) to photoconvert the Dendra at a specific spot, 405nm, 491nm, 561nm and 640nm lasers and a camera iXonEM (Andor Technology) with a pixel size of 16 μ m. Images Acquisitions were performed on MetaFluor, Metavue (Molecular Devices) and Live Acquisition (TILL Photonics) softwares. Images and movies were analyzed on Image J software.

Statistics

Averages are expressed +/-SE, and significance of differences was evaluated with the student t-test. GraphPad Prism and Kaleidagraph softwares were used to plot data.

Acknowledgements

We thank A. Trautmann and G. Bismuth for helpful discussions and comments on the manuscript, Annemarie Lellouch for mLck, and the Imaging Facility of the Cochin Institute. This work was supported by Association pour la Recherche contre le Cancer (ARC, SFI20101201952, SFI 20121205561), CNRS, INSERM and Université Paris

Descartes. C.G. and N.A. were supported by the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by ARC.

Figure legends

Figure 1: Composition of the antisynapse.

Immunolabelings performed on 3-5 minutes T/APC conjugates composed of Jurkat T cells and Raji B cells (**A**), primary blood human T cells and mature dendritic cells (**B**), murine T cell and B cell (**C** right panel) or dendritic cell (**C** two left panels) within a lymph node slice. In (**A**), (**B** left panel) and (**D**), APC had been loaded with 200 ng/ml of SAg. The other conjugates have been formed in absence of SAg. White arrows indicate the morphological deformations of the T cells associated with the presence of antisynapses. Nuclei were labeled with Hoechst (blue). Cytoskeleton labelings are displayed with an inverted gray scale. In (**C**) CD3 labeling intensity is coded with a pseudo-color scale. (**D**) The frequency of antisynapses for each marker was quantified during live imaging experiments in productive conjugates, i.e. in those in which the same marker was clustered at the synapse. PIP₃ was monitored with AKT-PH and rafts with mLck. 6-20 conjugates/marker.

APC are indicated by asterisks. Scale bars = 5 μ m

Figure 2: Antisynapse kinetics

Antisynapse kinetics performed in mLck-expressing Jurkat T cells conjugated with SAg-loaded Raji B cells. (**A**) T cells were centrifuged with Raji B cells for 5 sec (mean of 3 independent experiments, 8-18 conjugates/time point/experiment), and conjugates were fixed at different times. Synapses and antisynapses were defined by the presence of mLck. (**B**, **C**) Fura-2-loaded Jurkat T cells were added to Raji B cells and the conjugates were analyzed by live imaging. (**B**) Example of simultaneous monitoring of Ca level and mLck distribution at both the synapse and antisynapse. Asterisk indicates APC. (**C**) Quantification of the delays, after the initial contact, of the Ca rise, the antisynapse and synapse formation (12 conjugates) as well as of the duration of the antisynapse (22 conjugates).

Figure 3: The antisynapse disappears in favor of the synapse

(**A**) Jurkat T cells transfected with Dendra2-Lck were added to adherent Raji B cells. Lck, followed by excitation at 488 nm was photoconverted by a 405 nm flash focused on the antisynapse (blue spot). The photoconverted form of Lck, followed by excitation at 568nm, was initially observed at the antisynapse (first yellow arrow) but rapidly detected at the synapse (next yellow arrow). Asterisk indicates APC. (**B**) The mean fluorescence intensity of the

photoconverted form of Lck was quantified at the synaptic and antisynaptic areas. **(C)** LAT distribution was measured in 7 or 20 minute conjugates formed between Raji B cells and Jurkat T cells pretreated or not with 10 μ M nocodazole. The frequency of antisynapses was calculated on productive conjugates, i.e. those which have formed a synapse. Mean \pm SE of 2 independent experiments, 37-92 conjugates/experiment/condition.

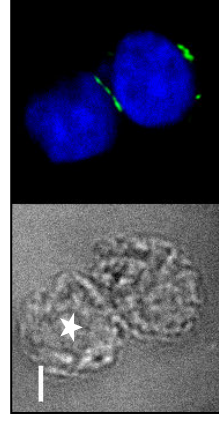
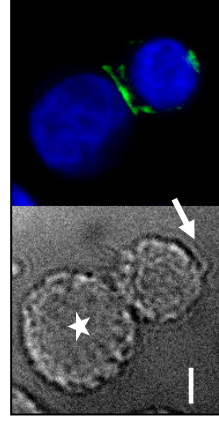
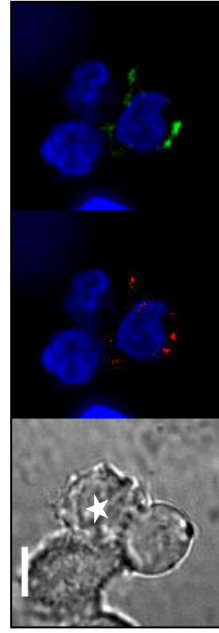
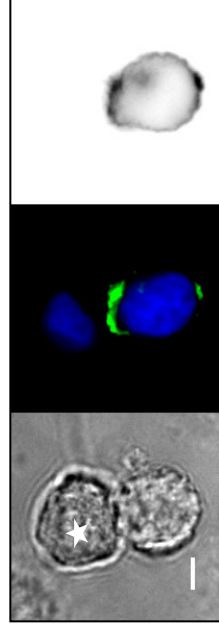
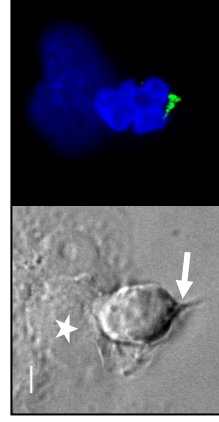
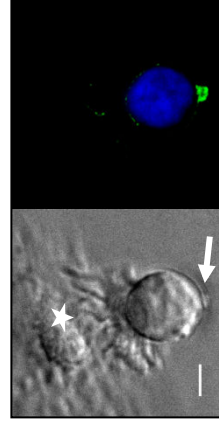
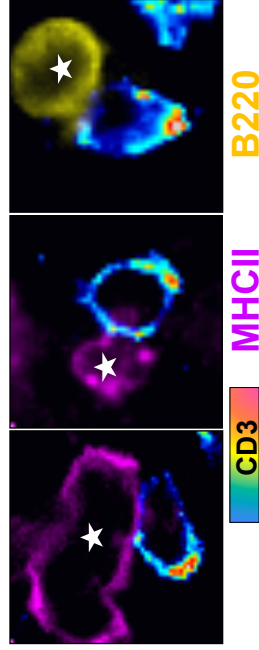
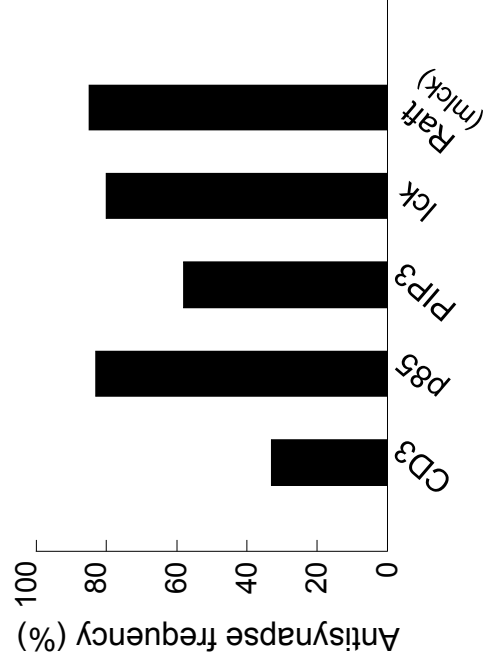
Figure 4: Antisynapse disappearance correlates with MTOC relocation

MTOC movements and antisynapse kinetics were monitored in Jurkat T cells expressing centrin and mLck. **(A)** Three time points for the same Jurkat T cell - Raji B cell conjugates, shown 25, 75 and 200 sec after the initial contact (top). The distance between the MTOC and the synapse, was measured as shown in the inset, and its time dependence displayed, together with the mLck mean fluorescence intensity at the antisynaptic zone. Asterisk indicates APC. **(B)** In the same series of experiments shown in figure 2A, the conjugates were synchronized by centrifugation and the frequency of MTOC relocated at the synapse was measured at different time simultaneously with antisynapse frequency. Mean \pm SE of 3 independent experiments, 8-18 conjugates/experiment/condition.

Figure 5: Regulation of antisynapse formation

(A) Frequencies of LAT and mLck antisynapses were calculated in mLck-expressing Jurkat T cells conjugated with Raji B cells 5 minutes earlier. LAT distribution was visualized by immunofluorescence. When specified, 10 μ M PP2 was added to the T cells 30 min before contact and kept during conjugate formation. **(B)** Antisynapse frequencies determined by Lck distribution were measured either in all Raji-T cell conjugates, or only in those leading to Pyk-2 activation at T/APC interface. JRT3 and J31.13 are Jurkat T cells deficient in TCR β . **(C)** Example of a conjugate with Pyk2 activation evidenced with an anti-phospho-Pyk-2 antibody and an antisynapse. White arrow indicates the morphological deformation of the T cell associated with the presence of antisynapse. Asterik indicates APC. **(D)** Frequencies of LAT antisynapses triggered upon contact of Jurkat T cells with beads coated with antibodies directed against CD3/CD28, LFA1 or ICAM1 (CD54). Activating or neutralizing LFA1 antibodies were used, Results have been normalized relative to the antisynapse frequency induced by CD3/CD28 coated beads. **(E)** Examples of synapses and antisynapses triggered in Jurkat T cells (upper panels) or PBT (lower panels) by beads coated with indicated antibodies. Antisynapses were detected by the green labeling of LAT for Jurkat cells and of Lck for PBT. Beads appear in black in the DIC images. Mean \pm SE of **(A)** 2-3 independent experiments, 28-79

conjugates/experiment/condition **(B)** 3-4 independent experiments, 20-50 conjugates/experiment/condition **(D)** 2-3 independent experiments, 25-61 conjugates/experiment/condition. Scale bar = 5 μ m.

A**B****C****D****Figure 1**

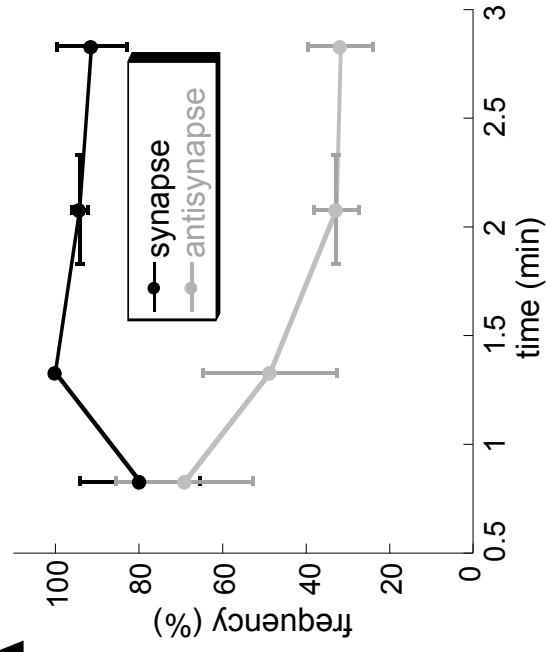
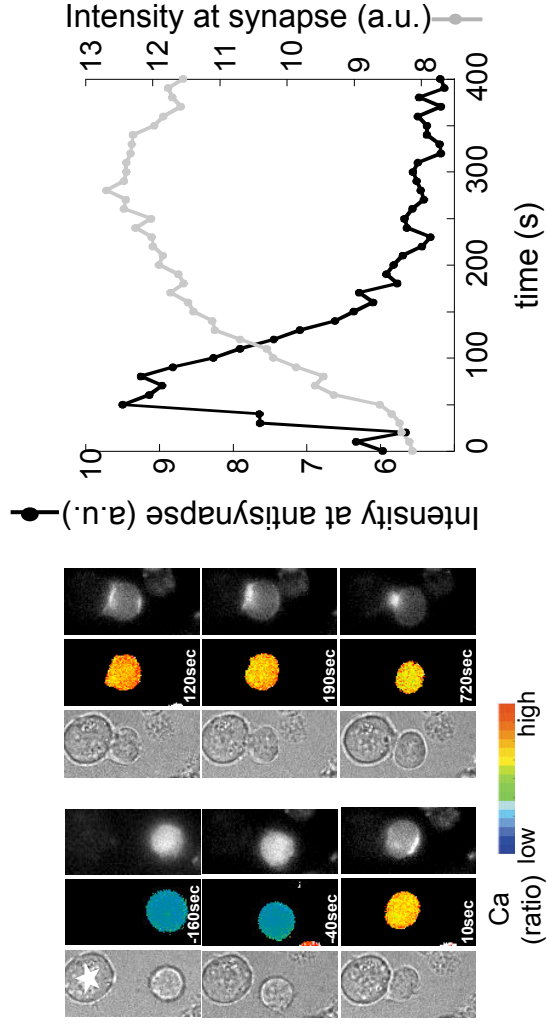
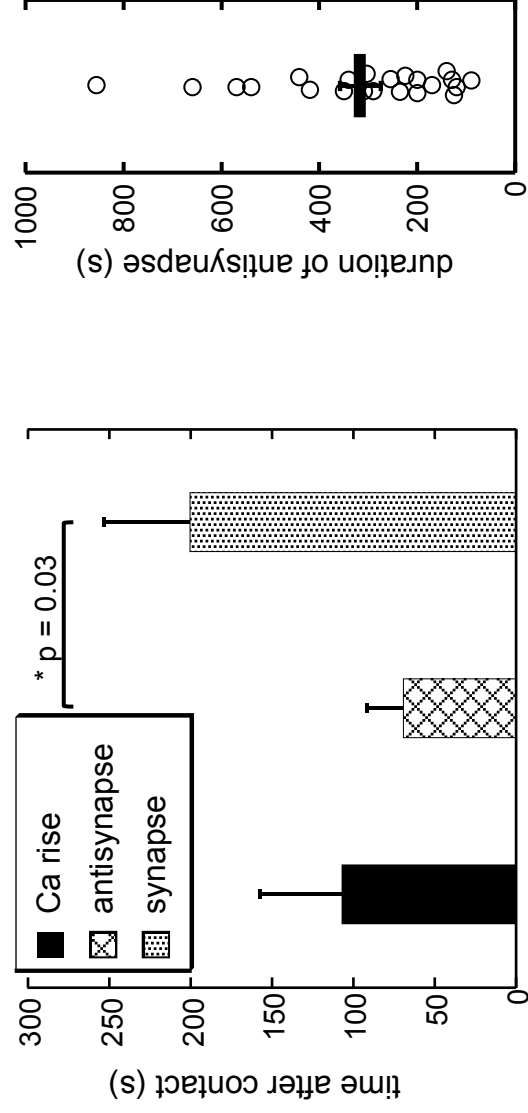
A**B****C****Figure 2**

Figure 3

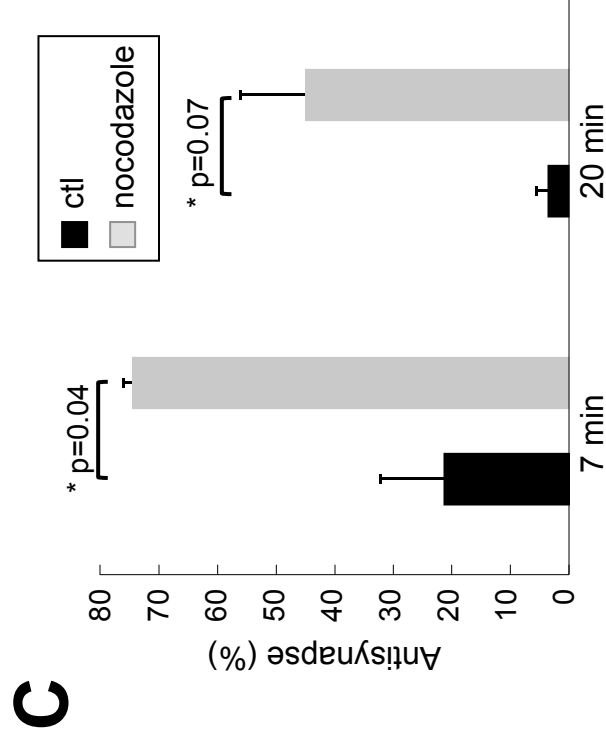
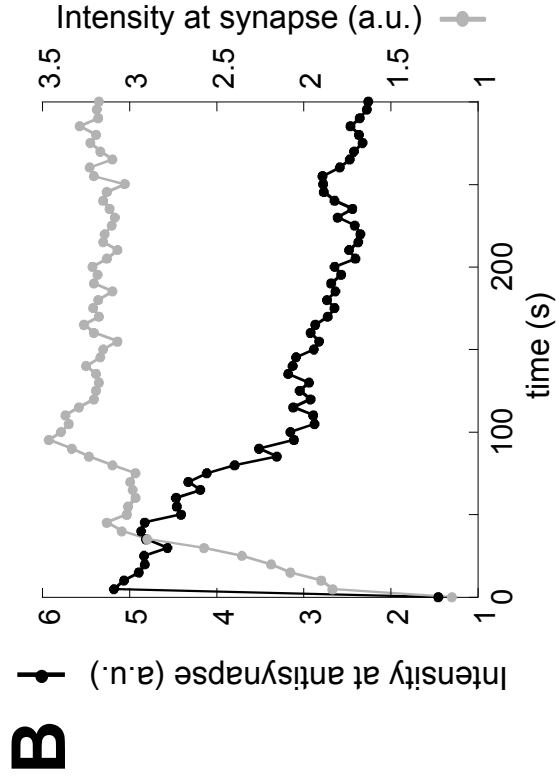
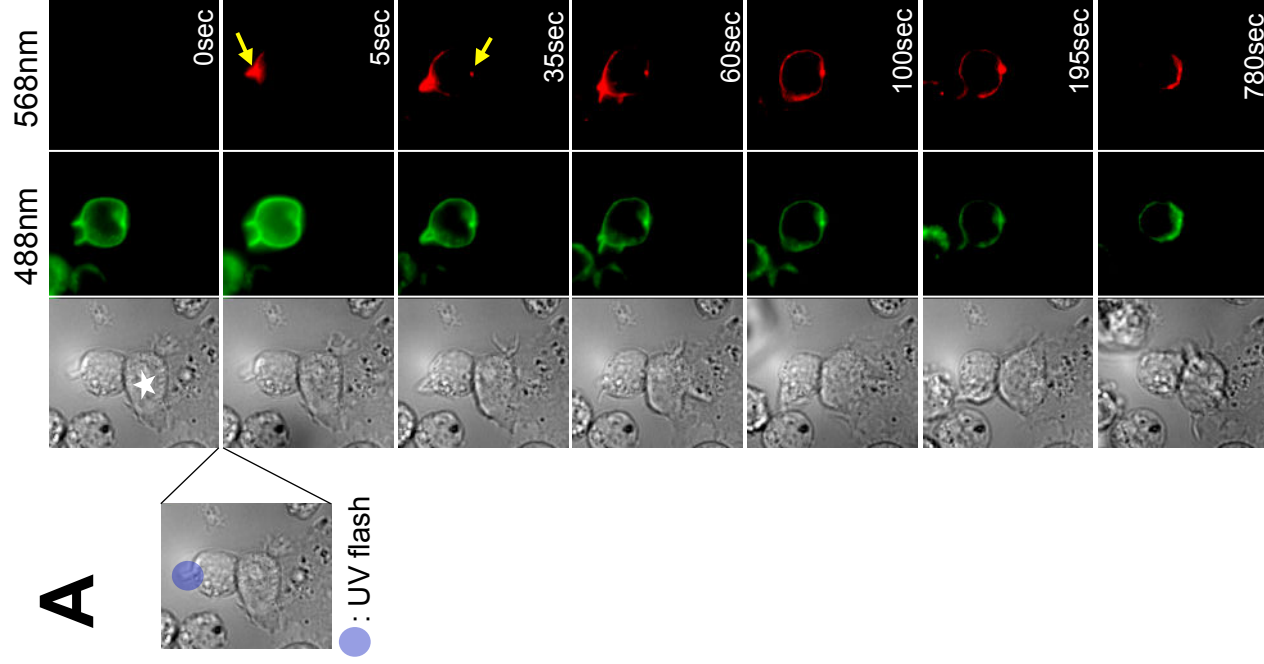
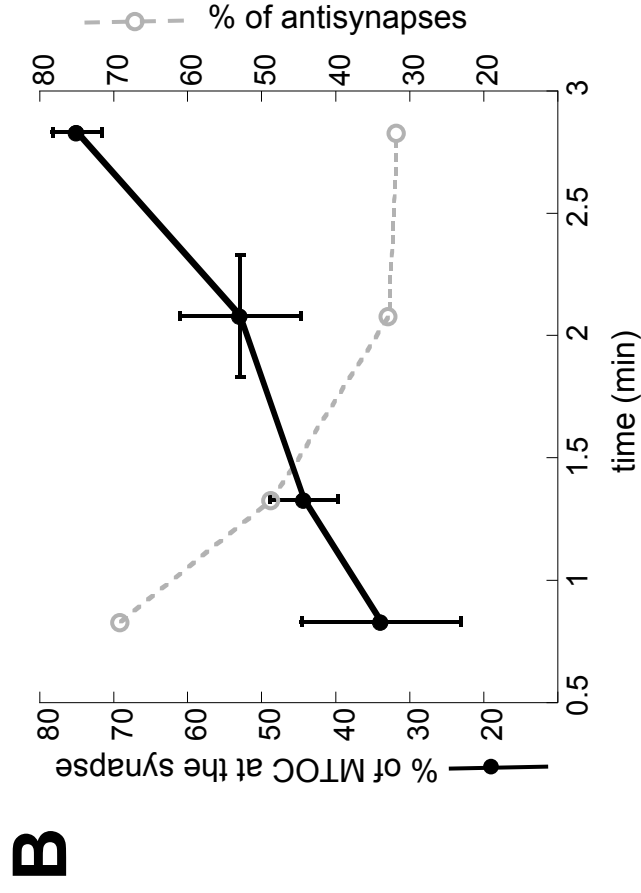
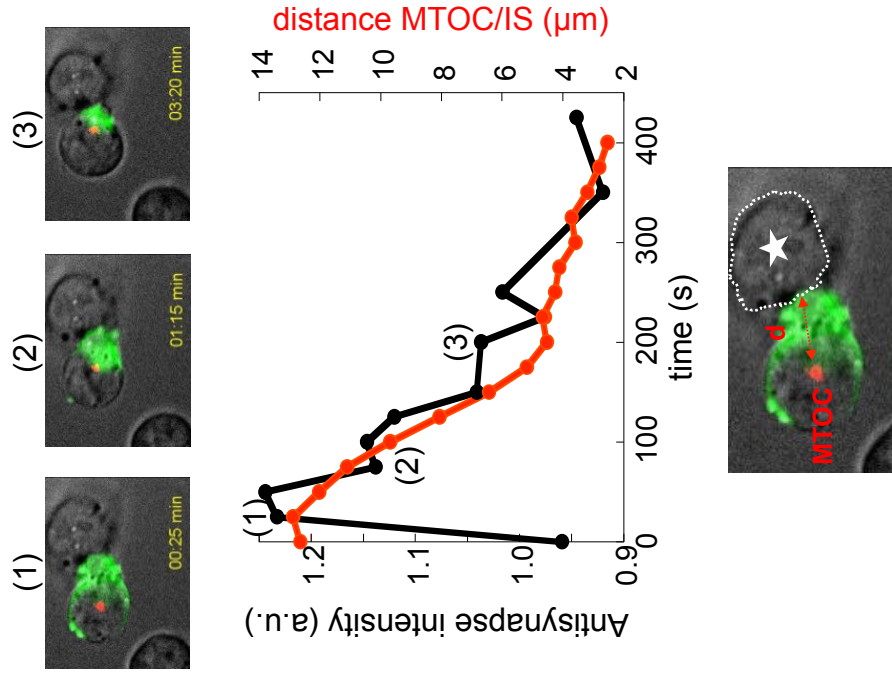


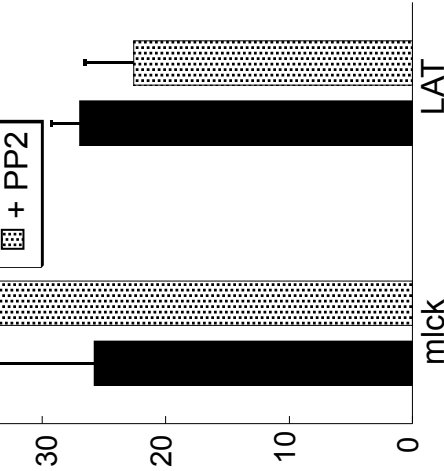
Figure 4



A

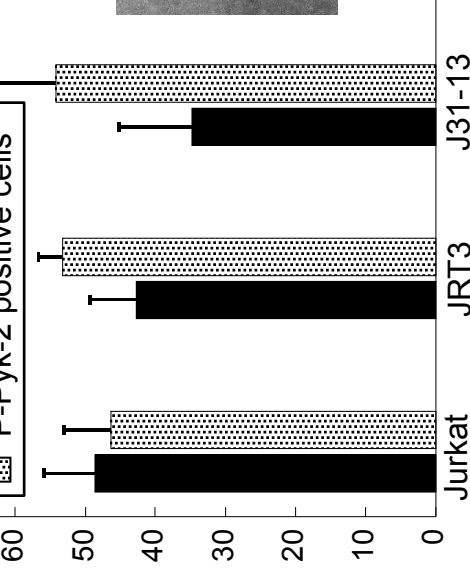
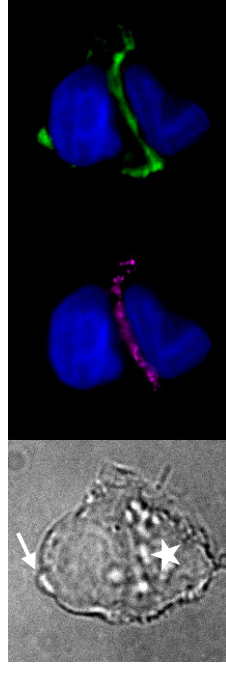
Antisynapse frequency (%)

■ ctrl
▤ + PP2

**B**

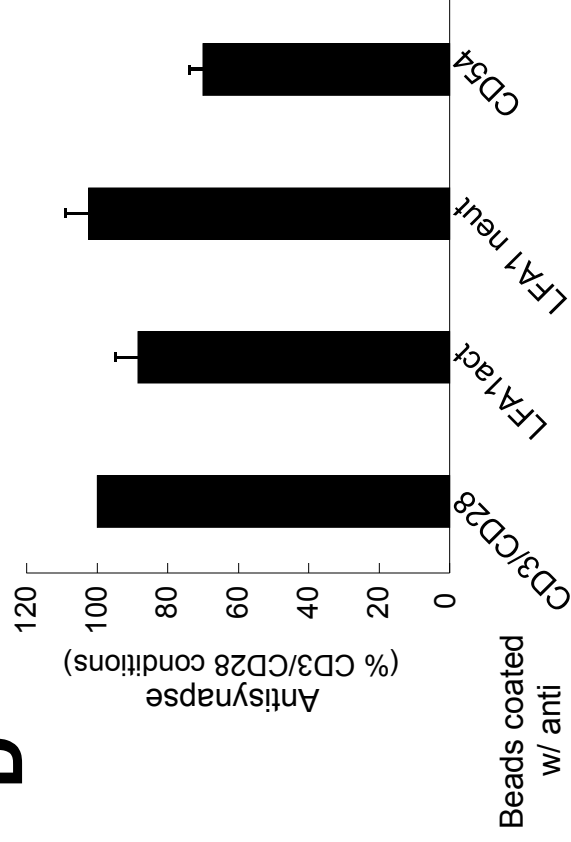
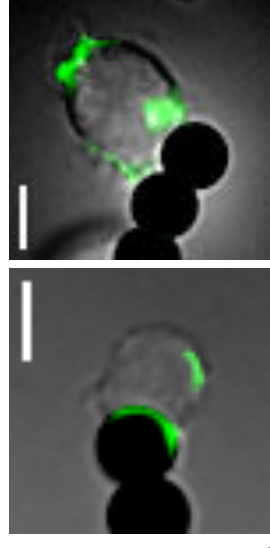
Antisynapse frequency (%)

■ all cells
▤ P-Pyk-2 positive cells

**C**

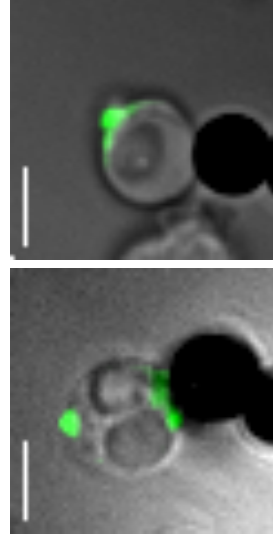
P-Pyk2

Lck

DAntisynapse
(% CD3/CD28 conditions)Beads coated
w/ anti**E**Bead coated
w/ anti

CD3/CD28

MHC1



CD3/CD28

LFA-1

Bead coated
w/ anti**Figure 5**

Supplementary Figure legends

Figure S1 : Composition of the antisynapse

(A) Examples of PIP₂ (left) and phospho-ERK (right) antisynapses detected in conjugates formed between primary human T cells and immature (iDC) or mature (mDC) dendritic cells. White arrow indicates the morphological deformations of the T cells associated with the presence of antisynapses. (B) Examples of proximal ligation assays realized for LAT + Lck (left) or PLC γ 1 + LAT (right) in Jurkat T cell/Raji B cell conjugates. Green spots indicate locations where the two proteins are close enough to trigger the ligation assay. DIC images are superposed with a z-projection of the fluorescent proximal ligation signals (green). (C) Example of conjugate formed between a Raji B cell and a mLck expressing PBT. The perisynaptic CD43 distribution is clearly distinct from that of mLck. APC are indicated by asterisks. Scale bar= 5 μ m

Figure S2 : Role of actin in antisynapse formation

On Jurkat T cell/Raji B cell conjugates, actin relocates at the antisynapse as well as Lck (upper panel). Pretreatment of T cells with 10nM latrunculin affect neither actin polymerization nor antisynapse formation (middle panel). At 500 nM, latrunculin prevents actin polymerization but also conjugates formation. White arrows indicate membrane deformations associated with the antisynapse (lower panel). APC are indicated by asterisks.

Figure S3 : Signaling pathways involved in antisynapse formation

(A) CD3-induced Ca rise (measured by spectrofluorimetry) induced in Jurkat T cells preincubated, when specified, with 10 μ M PP2 or 25 μ M BAPTA/AM for 30 minutes. (B) Abrogating Ca rise in Jurkat T cells with BAPTA does not affect the formation of antisynapses (as detected by mLck, phospho-tyrosine or PLC γ 1). (C) Decreasing the concentration of SAg loaded on the Raji B cells does not reduce the frequency of antisynapses in conjugates formed with Jurkat T cells expressing mLck. Results are expressed as % of the frequency obtained with 200 ng/ml SAg. Mean \pm SE of 2-5 independent experiments, 29-54 conjugates/experiment/condition. (D) Preincubation of T cells with

PP2 reduces the activation of src kinase as attested by the decrease of the mean phospho-src intensity at the IS on T/Raji conjugates (results from 42-45 conjugates/condition).

Figure S4 : Characterization of JRT3 and J31-31 cell lines

(A) Surface expression of CD3 on Jurkat T cells, JRT3 or J31.13 clones measured by FACS. (B) Ca response induced in these different clones by anti-CD3 measured with a spectrofluorimeter. Mean of 2-3 experiments.

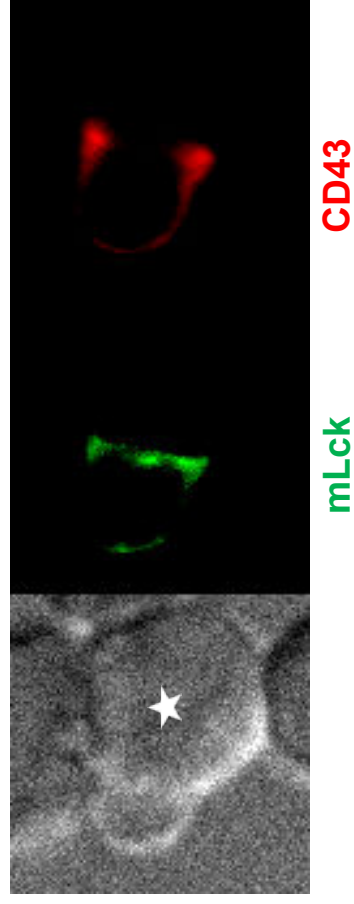
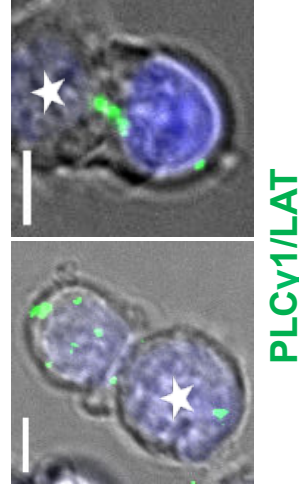
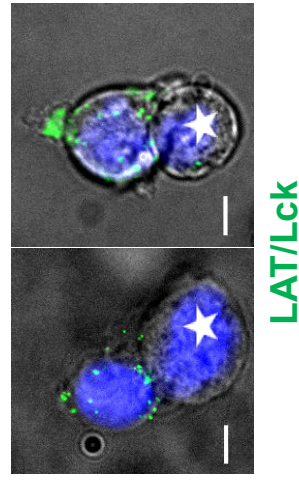
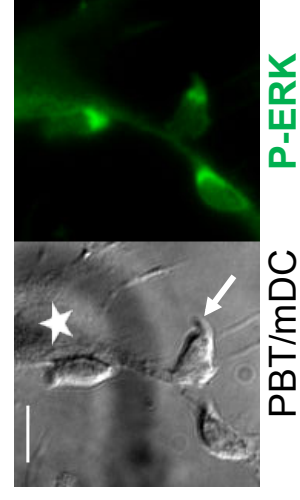
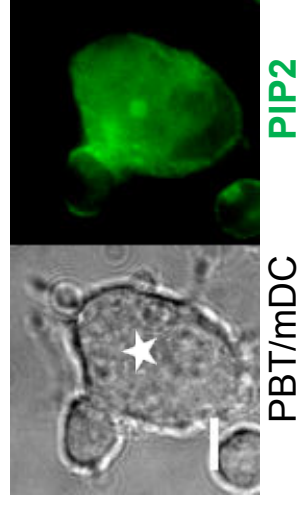
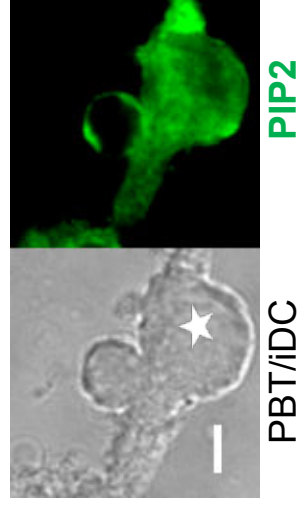


Figure S1

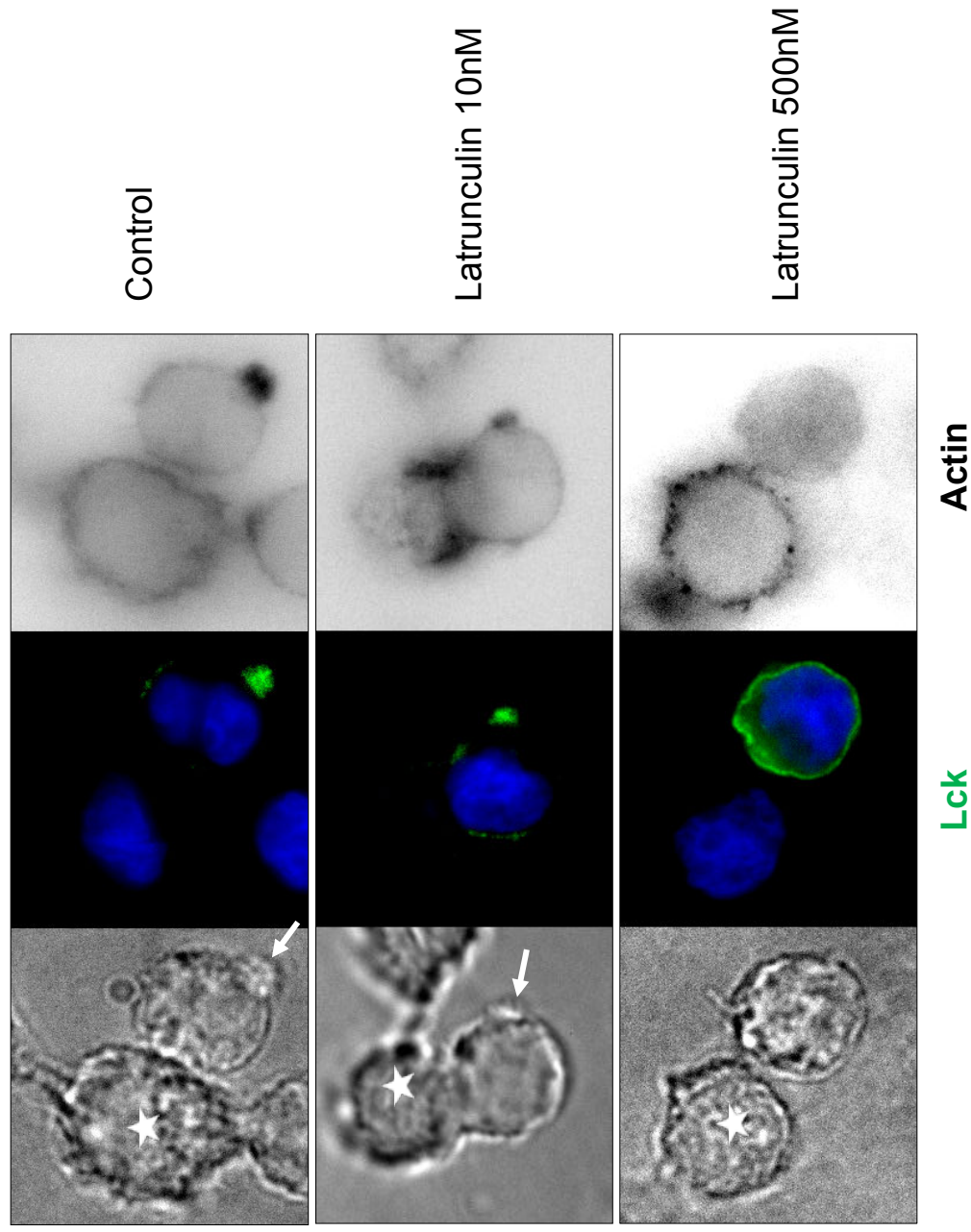


Figure S2

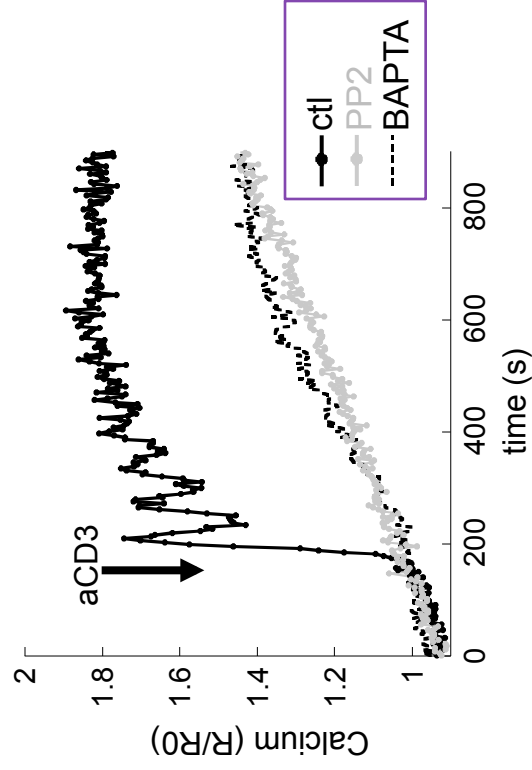
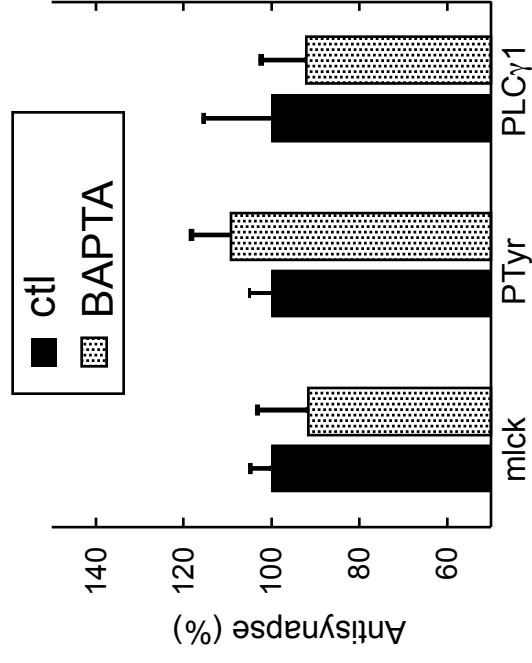
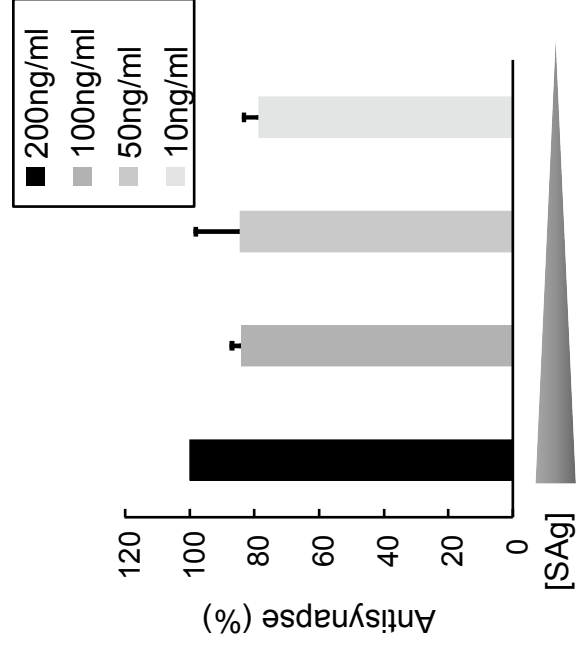
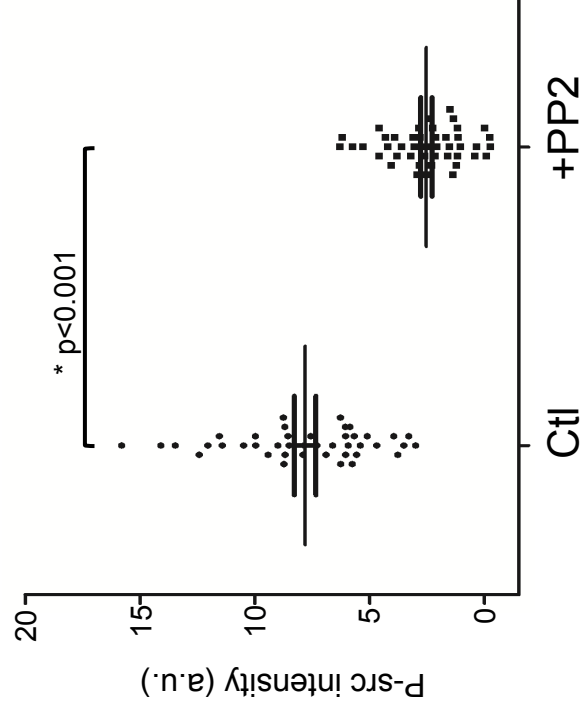
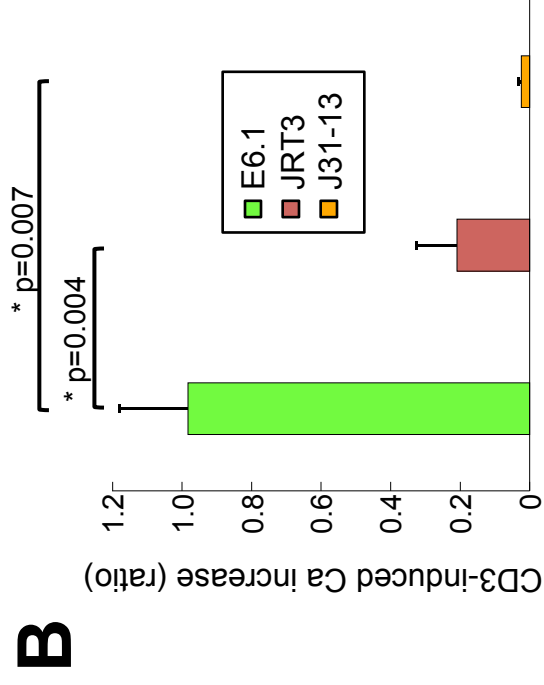
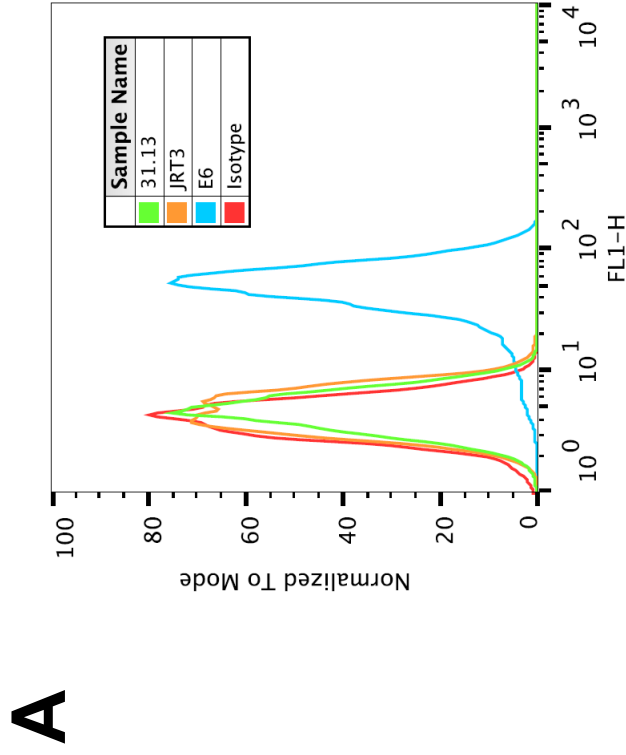
A**B****C****D**

Figure S4



References

- Alarcon, B., Mestre, D., and Martinez-Martin, N. (2011). The immunological synapse: a cause or consequence of T-cell receptor triggering? *Immunology* *133*, 420-425.
- Alcover, A., Mariuzza, R.A., Ermonval, M., and Acuto, O. (1990). Lysine 271 in the transmembrane domain of the T-cell antigen receptor beta chain is necessary for its assembly with the CD3 complex but not for alpha/beta dimerization. *J Biol Chem* *265*, 4131-4135.
- Asperti-Boursin, F., Real, E., Bismuth, G., Trautmann, A., and Donnadieu, E. (2007). CCR7 ligands control basal T cell motility within lymph node slices in a phosphoinositide 3-kinase- independent manner. *J Exp Med* *204*, 1167-1179.
- Azar, G.A., Lemaître, F., Robey, E.A., and Bousso, P. (2010). Subcellular dynamics of T cell immunological synapses and kinapses in lymph nodes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 3675-3680.
- Barr, V.A., Bernot, K.M., Srikanth, S., Gwack, Y., Balagopalan, L., Regan, C.K., Helman, D.J., Sommers, C.L., Oh-Hora, M., Rao, A., and Samelson, L.E. (2008). Dynamic movement of the calcium sensor STIM1 and the calcium channel Orai1 in activated T-cells: puncta and distal caps. *Mol Biol Cell* *19*, 2802-2817.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur J Immunol* *35*, 1741-1753.
- Campi, G., Varma, R., and Dustin, M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* *202*, 1031-1036.
- Chemin, K., Bohineust, A., Dogniaux, S., Turret, M., Guegan, S., Miro, F., and Hivroz, C. (2012). Cytokine secretion by CD4+ T cells at the immunological synapse requires Cdc42-dependent local actin remodeling but not microtubule organizing center polarity. *J Immunol* *189*, 2159-2168.
- Chudakov, D.M., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2007). Tracking intracellular protein movements using photoswitchable fluorescent proteins PS-CFP2 and Dendra2. *Nat Protoc* *2*, 2024-2032.
- Conche, C., Boulla, G., Trautmann, A., and Randriamampita, C. (2009). T cell adhesion primes antigen receptor-induced calcium responses through a transient rise in adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Immunity* *30*, 33-43.
- Contento, R.L., Campello, S., Trovato, A.E., Magrini, E., Anselmi, F., and Viola, A. (2010). Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling. *Embo J* *29*, 4035-4047.
- Costello, P.S., Gallagher, M., and Cantrell, D.A. (2002). Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat Immunol* *3*, 1082-1089.
- Cullinan, P., Sperling, A.I., and Burkhardt, J.K. (2002). The distal pole complex: a novel membrane domain distal to the immunological synapse. *Immunol Rev* *189*, 111-122.
- DeFord-Watts, L.M., Dougall, D.S., Belkaya, S., Johnson, B.A., Eitson, J.L., Roybal, K.T., Barylko, B., Albanesi, J.P., Wulfig, C., and van Oers, N.S. (2011). The CD3 zeta subunit contains a phosphoinositide-binding motif that is required for the stable accumulation of TCR-CD3 complex at the immunological synapse. *J Immunol* *186*, 6839-6847.
- Deford-Watts, L.M., Tassin, T.C., Becker, A.M., Medeiros, J.J., Albanesi, J.P., Love, P.E., Wulfig, C., and van Oers, N.S. (2009). The cytoplasmic tail of the T cell receptor CD3 epsilon subunit contains a phospholipid-binding motif that regulates T cell functions. *J Immunol* *183*, 1055-1064.
- Delon, J., Bercovici, N., Liblau, R., and Trautmann, A. (1998). Imaging antigen recognition by naive CD4+ T cells: compulsory cytoskeletal alterations for the triggering of a Ca²⁺ response. *Eur J Immunol* *28*, 716-729.
- Doucey, M.A., Legler, D.F., Faroudi, M., Boucheron, N., Baumgaertner, P., Naeher, D., Cebecauer, M., Hudrisier, D., Ruegg, C., Palmer, E., *et al.* (2003). The beta1 and beta3 integrins promote T cell receptor-mediated cytotoxic T lymphocyte activation. *J Biol Chem* *278*, 26983-26991.
- Dustin, M.L. (2008). T-cell activation through immunological synapses and kinapses. *Immunol Rev* *221*, 77-89.
- Faure, S., Salazar-Fontana, L.I., Semichon, M., Tybulewicz, V.L., Bismuth, G., Trautmann, A., Germain, R.N., and Delon, J. (2004). ERM proteins regulate cytoskeleton relaxation promoting T cell-APC conjugation. *Nat Immunol* *5*, 272-279.
- Galvagni, F., Baldari, C.T., Oliviero, S., and Orlandini, M. (2012). An apical actin-rich domain drives the establishment of cell polarity during cell adhesion. *Histochem Cell Biol* *138*, 419-433.

- Garbi, N., Hammerling, G.J., Probst, H.C., and van den Broek, M. (2010). Tonic T cell signalling and T cell tolerance as opposite effects of self-recognition on dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 22, 601-608.
- Gerard, A., Beemiller, P., Friedman, R.S., Jacobelli, J., and Krummel, M.F. (2013). Evolving immune circuits are generated by flexible, motile, and sequential immunological synapses. *Immunol Rev* 251, 80-96.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
- Holdorf, A.D., Lee, K.H., Burack, W.R., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). Regulation of Lck activity by CD4 and CD28 in the immunological synapse. *Nat Immunol* 3, 259-264.
- Houk, A.R., Jilkin, A., Mejean, C.O., Boltyskiy, R., Dufresne, E.R., Angenent, S.B., Altschuler, S.J., Wu, L.F., and Weiner, O.D. (2012). Membrane tension maintains cell polarity by confining signals to the leading edge during neutrophil migration. *Cell* 148, 175-188.
- Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., and Davis, M.M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* 7, 247-255.
- Judokusumo, E., Tabdanov, E., Kumari, S., Dustin, M.L., and Kam, L.C. (2012). Mechanosensing in T lymphocyte activation. *Biophys J* 102, L5-7.
- Kupfer, A., and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 133, 2762-2766.
- Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* 165, 1565-1580.
- Le Floch, A., Tanaka, Y., Bantilan, N.S., Voisinne, G., Altan-Bonnet, G., Fukui, Y., and Huse, M. (2013). Annular PIP3 accumulation controls actin architecture and modulates cytotoxicity at the immunological synapse. *J Exp Med* 210, 2721-2737.
- Maly, I.V. (2011). Systems biomechanics of centrosome positioning: A conserved complexity. *Commun Integr Biol* 4, 230-235.
- Moreau, H.D., Lemaitre, F., Terriac, E., Azar, G., Piel, M., Lennon-Dumenil, A.M., and Bousso, P. (2012). Dynamic in situ cytometry uncovers T cell receptor signaling during immunological synapses and kinapses in vivo. *Immunity* 37, 351-363.
- Norcross, M.A. (1984). A synaptic basis for T-lymphocyte activation. *Ann Immunol (Paris)* 135D, 113-134.
- Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Philipsen, L., Engels, T., Schilling, K., Gurbiel, S., Fischer, K.D., Tedford, K., Schraven, B., Gunzer, M., and Reichardt, P. (2013). Multimolecular analysis of stable immunological synapses reveals sustained recruitment and sequential assembly of signaling clusters. *Mol Cell Proteomics* 12, 2551-2567.
- Randriamampita, C., Boulla, G., Revy, P., Lemaitre, F., and Trautmann, A. (2003). T cell adhesion lowers the threshold for antigen detection. *Eur J Immunol* 33, 1215-1223.
- Randriamampita, C., Mouchacca, P., Malissen, B., Marguet, D., Trautmann, A., and Lellouch, A.C. (2008). A novel ZAP-70 dependent FRET based biosensor reveals kinase activity at both the immunological synapse and the antisynapse. *PLoS ONE* 3, e1521.
- Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B., and Trautmann, A. (2001). Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2, 925-931.
- Salmon, H., Rivas-Caccedo, A., Asperti-Boursin, F., Lebugle, C., Bourdoncle, P., and Donnadieu, E. (2011). Ex vivo imaging of T cells in murine lymph node slices with widefield and confocal microscopes. *J Vis Exp*.
- Schneider, U., Schwenk, H.U., and Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19, 621-626.
- Singleton, K.L., Roybal, K.T., Sun, Y., Fu, G., Gascoigne, N.R., van Oers, N.S., and Wulfig, C. (2009). Spatiotemporal patterning during T cell activation is highly diverse. *Sci Signal* 2, ra15.
- Stinchcombe, J.C., Bossi, G., Booth, S., and Griffiths, G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity* 15, 751-761.

- Sun, Y., Dandekar, R.D., Mao, Y.S., Yin, H.L., and Wulfig, C. (2011). Phosphatidylinositol (4,5) biphosphate controls T cell activation by regulating T cell rigidity and organization. *PLoS One* *6*, e27227.
- Thauland, T.J., and Parker, D.C. (2010). Diversity in immunological synapse structure. *Immunology* *131*, 466-472.
- Trautmann, A., and Valitutti, S. (2003). The diversity of immunological synapses. *Current Opinion in Immunology* *15*, 249-254.
- Verstraeten, S.V., Mackenzie, G.G., and Oteiza, P.I. (2010). The plasma membrane plays a central role in cells response to mechanical stress. *Biochim Biophys Acta* *1798*, 1739-1749.

II. ARTICLE 2 (PUBLIÉ) : THE SCAFFOLDING PROTEIN DLG1 IS A NEGATIVE
REGULATOR OF CELL-FREE VIRUS INFECTIVITY BUT NOT OF CELL-TO-
CELL HIV-1 TRANSMISSION IN T CELLS

The Scaffolding Protein Dlg1 Is a Negative Regulator of Cell-Free Virus Infectivity but Not of Cell-to-Cell HIV-1 Transmission in T Cells

Patrycja Nzounza^{1,2,3}, Maxime Chazal^{1,2,3}, Chloé Guedj^{1,2,3}, Alain Schmitt^{1,2,3}, Jean-Marc Massé^{1,2,3}, Clotilde Randriamampita^{1,2,3}, Claudine Pique^{1,2,3}, Bertha Cecilia Ramirez^{1,2,3*}

1 INSERM, U1016, Institut Cochin, Paris, France, **2** CNRS, UMR8104, Paris, France, **3** Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

Abstract

Background: Cell-to-cell virus transmission of Human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) is predominantly mediated by cellular structures such as the virological synapse (VS). The VS formed between an HIV-1-infected T cell and a target T cell shares features with the immunological synapse (IS). We have previously identified the human homologue of the *Drosophila* Discs Large (Dlg1) protein as a new cellular partner for the HIV-1 Gag protein and a negative regulator of HIV-1 infectivity. Dlg1, a scaffolding protein plays a key role in clustering protein complexes in the plasma membrane at cellular contacts. It is implicated in IS formation and T cell signaling, but its role in HIV-1 cell-to-cell transmission was not studied before.

Methodology/Principal Findings: Kinetics of HIV-1 infection in Dlg1-depleted Jurkat T cells show that Dlg1 modulates the replication of HIV-1. Single-cycle infectivity tests show that this modulation does not take place during early steps of the HIV-1 life cycle. Immunofluorescence studies of Dlg1-depleted Jurkat T cells show that while Dlg1 depletion affects IS formation, it does not affect HIV-1-induced VS formation. Co-culture assays and quantitative cell-to-cell HIV-1 transfer analyses show that Dlg1 depletion does not modify transfer of HIV-1 material from infected to target T cells, or HIV-1 transmission leading to productive infection via cell contact. Dlg1 depletion results in increased virus yield and infectivity of the viral particles produced. Particles with increased infectivity present an increase in their cholesterol content and during the first hours of T cell infection these particles induce higher accumulation of total HIV-1 DNA.

Conclusion: Despite its role in the IS formation, Dlg1 does not affect the VS and cell-to-cell spread of HIV-1, but plays a role in HIV-1 cell-free virus transmission. We propose that the effect of Dlg1 on HIV-1 infectivity is at the stage of virus entry.

Citation: Nzounza P, Chazal M, Guedj C, Schmitt A, Massé J-M, et al. (2012) The Scaffolding Protein Dlg1 Is a Negative Regulator of Cell-Free Virus Infectivity but Not of Cell-to-Cell HIV-1 Transmission in T Cells. PLoS ONE 7(1): e30130. doi:10.1371/journal.pone.0030130

Editor: Clive M. Gray, University of Cape Town, South Africa

Received: July 12, 2011; **Accepted:** December 13, 2011; **Published:** January 17, 2012

Copyright: © 2012 Nzounza et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was supported by grants from SIDACTION, the Agence Nationale de Recherche contre le SIDA (ANRS) and from the Institut Cochin. PN is supported by a fellowship from the French Ministère de la Recherche et la Technologie (MRT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: cecilia.ramirez@inserm.fr

Introduction

Retrovirus spread depends on the correct assembly, budding and transmission of viral particles both by cell-free viral particles and by virus cell-to-cell transfer. *Human immunodeficiency virus type-1* (HIV-1) cell-to-cell virus transmission is known to be more efficient than cell-free virus transmission [1,2,3,4] and the former mode of transmission is probably predominant *in vivo* between cells close to each other, in tissues where primary infection occurs. Cell-to-cell viral transmission is mediated by cellular structures that allow the movement of HIV-1 between cells, such as membrane nanotubes [5], filopods [6] and the stable macromolecular adhesive contact known as virological synapse (VS). The VS forms a tight cleft between an infected cell and a target cell [7,8,9,10,11] and appears to be the dominant structure involved in cell-to-cell spread of HIV-1 in T cells [12,13]. VS formation is initiated by the interaction between the viral envelope glycoprotein Env on the surface of the infected cell and the cellular receptor CD4 and the co-receptors CXCR4 or CCR5 on the target cell. This cellular

conjugate is stabilized by the adhesion molecule lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) together with talin and actin on the target cell [7,8] and the intracellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), which interacts with LFA-1, on the infected cell [13]. The VS shares features and components with the immunological synapse (IS), the cellular conjugate formed between a T cell and an antigen-presenting cell (APC). The IS is formed by recognition between the T cell receptor (TCR) on the T cell and the cognate peptide-major histocompatibility complex (pMHC) on the APC. Importantly, it was reported that HIV-1 infection impairs the formation of the IS [14].

Maximum efficiency of virus assembly, budding and transmission of HIV-1 depend on the host cell machinery recruited by the viral protein Gag that interacts with numerous host proteins, complexes and structures [15,16,17]. We previously identified the human homologue of *Drosophila* Discs Large (Dlg1) protein as a new cellular partner of HIV-1 Gag and described Dlg1 as a negative regulator of virus particle infectivity [18]. In Dlg1-depleted cells, Gag production and maturation or virus release were not

affected, whereas the viruses produced were fivefold more infectious [18].

Dlg1 is a membrane-associated guanylate kinase (MAGUK), it is an important adaptor protein involved in the assembly of protein complexes at sites of cell-to-cell contact. Dlg1 is a modular protein consisting of a proline-rich N-terminal region, multiple PDZ (PSD-95–DLG–ZO-1) domains, a Src homology 3 domain, a HOOK (protein 4.1 binding) domain and a GUK-like domain. Dlg1 is a scaffolding protein recruited beneath the plasma membrane at cellular contacts such as synapses, adherent junctions and tight junctions, where it plays a key role in clustering protein complexes. It is implicated in T cell signaling, polarity [19], morphology and migration, and in IS formation [20]. In T cells, Dlg1 interacts with the cellular surface proteins, PTA-1, Kv1.3, CD2, and with LFA-1 and it localizes transiently in the IS upon antigen presentation [21]. Dlg1 recruited to the IS interacts with key components of T cell signaling [20,22,23], it may link the TCR signaling machinery with regulators of the cytoskeleton. Dlg1 is thought to be involved in coordinating T cell activation and actin polymerization induced by the lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) and mediated by the Wiskott–Aldrich syndrome protein, required for synaptic lipid raft and TCR clustering [24]. In Jurkat T cells, Dlg1 was reported to be an activation antagonist that would promote receptor internalization after initial TCR engagement [21]. It was also shown in Jurkat T cells that Dlg1 and ezrin cooperate to control IS architecture and T cell activation [25]. In addition, it was reported that Dlg1 interacts with the Zeta-chain-associated protein kinase 70 kDa (Zap70) involved in the IS [26,27] and that Zap70 in donor HIV-1-infected cells was involved in HIV-1 cell-to-cell transmission [28].

Although it is clear that Dlg1 plays a key role in T cells by organizing signaling complexes at the IS, its role in the VS or in cell-to-cell virus transmission has not been studied. Given these key roles of Dlg1, we expected that it could affect VS formation and/or HIV-1 cell-to-cell transmission. In this study the possible implication of Dlg1 in HIV-1 infection of a natural target of the virus was investigated in T cells depleted of Dlg1. We demonstrate for the first time that despite the key role of Dlg1 in the IS formation and T cell signaling, Dlg1 does not affect VS formation or cell-to-cell spread of HIV-1. Our results show a specific role of Dlg1 in HIV-1 cell-free virus transmission and allow us to postulate that by modifying viral cholesterol content Dlg1 affects the step of virus-cell fusion.

Materials and Methods

Cells and cell culture

CD4+/CXCR4+ Jurkat T cells (clone 20; a kind gift of Dr. Olivier Schwartz, Institut Pasteur, Paris, France), APC (Raji B cells; a kind gift of Dr. Georges Bismuth, Institut Cochin, Paris, France) and Jurkat LTR-luciferase T cells (1G5 cells; AIDS Research and Reference Reagent Program) were maintained in complete RPMI medium: RPMI 1640 (Gibco) supplemented with 10% FCS, streptomycin (100 µg/mL; Gibco), penicillin (100 U/mL; Gibco), glucose (0.43%, Gibco) and glutamine (2 mM; Gibco). Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from whole blood or buffy coats (Établissement Français du Sang, St Vincent de Paul, Paris, France) by Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient centrifugation. Primary CD4+ T cells were purified by negative selection with a CD4+ T cell enrichment kit (Human CD4 T lymphocyte enrichment set-DM, BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. The primary CD4+ T cells were first activated with phytohemagglutinin A (PHA-L; 3.0 µg/mL; Sigma-Aldrich)

and interleukin-2 (IL2; 50 IU/mL; PeproTech) then maintained in culture with IL2 (50 IU/mL). 293T and HeLa P4.2 cells (Hela-CD4-HIV-LTR-lacZ cells) were maintained in DMEM medium (Gibco) supplemented with 10% FCS, streptomycin (100 µg/mL), penicillin (100 U/mL) and glutamine (2 mM).

Antibodies

Primary antibodies used to detect the HIV-1 envelope protein on immunoblots were the anti-gp120 goat polyclonal (1/10000; Abcam) and the monoclonal antibody (mAb) anti-Env 5F7 (1/200; AIDS Research and Reference Reagent Program) [29]. Other primary antibodies used on immunoblots were: the HIV-1 anti-CA-p24 #24-2 mAb for HIV-1 Gag (1/5000; AIDS Research and Reference Reagent Program), the anti-tubulin mAb (1/5000; Sigma-Aldrich) for tubulin, the anti-GAPDH 6C5 mAb (1/1000; Santa Cruz Biotechnology) for GAPDH. The anti-PSD-95 mAb (PDZ domain; US Biological) was used for detection of Dlg1 on immunoblots (1/2500) and by immunofluorescence (IF; 1/100). Other primary antibodies used for IF were the HIV-1_{SFE} p24 rabbit antiserum (1/5000; AIDS Research and Reference Reagent Program) for Gag, the anti-CD4 mAb MAB379 (1/50; R&D systems) for the CD4 receptor. The anti-pericentrin rabbit polyclonal antibodies (1/2500; Abcam) were used to visualize the microtubule organizing center (MTOC) by IF and the 4G10 mAb (1/2; Ubi) for phosphotyrosine. Primary antibodies were detected with Cy3-, Cy5-, Alexa 568-, or Alexa 647-conjugated goat anti-mouse (1/500; Invitrogen), goat anti-rabbit (1/500; Invitrogen), donkey anti-mouse (1/2000; Invitrogen), or donkey anti-rabbit (1/2000; Invitrogen) secondary antibodies.

The anti-CD3-phycoerythrin (PE; 1/100; BD Pharmingen), anti-LFA-1 (1/20; Thermo Scientific), anti-CD4-PE (1/20; Beckman Coulter), anti-Human CD54-biotin (anti ICAM-1; 1/100; eBioscience), anti-CXCR4 12G5 mAb (1/100; AIDS Research and Reference Reagent Program) [30] and anti-Env 5F7 (1/20) were used to detect CD3, LFA-1, CD4, ICAM-1, CXCR4 and HIV-1 Env respectively by flow cytometry. PE-conjugated secondary antibodies (1/200; Dako) or PE-conjugated streptavidin (1/1000; eBioscience) were used when necessary. For intracellular Gag measurements the anti-HIV-p24 KC57-PE mAb (1/500; Coulter Beckman) was used.

Plasmids

The HIV-1 proviral clones pNL4-3 and LAL2 were obtained from the NIH AIDS Research and Reference Reagent Program. The luciferase-expressing vector pNLuc [31] and the envelope protein expression vector pIINL4env [32] were kind gifts from Dr. Eric Freed (NIH). The control siRNA [33] and the siRNA directed to the N-terminal domain specific for Dlg1 (nucleotides 569 to 587: 5'UGAAGUGAUAGGUCCAGAA3'; accession no. NM_004087) were obtained from QIAGEN (Courtaboeuf, France). The lentiviral vector pHIV-H1shRNADlg1 (pV2.3.60; generated by Vectalys, Labège, France) encodes the GFP gene and a short hairpin RNA (shRNA) directed against Dlg1 for its depletion (same sequence as for siRNA, nucleotides 569 to 587). The siRNA and shRNA specifically target the seven known isoforms (splicing variants; http://www.uniprot.org/uniprot/Q12959#section_comments) of human Dlg1, but not the other members of the Dlg family of MAGUKs [34]. The control lentiviral vector pshRNACtl encodes the GFP gene and an irrelevant shRNA control sequence. The lentiviral vector Mission shRNADlg1 (NM_004087; Sigma) encodes the puromycin resistance gene and an shRNA sequence for Dlg1 depletion (5'CCGGGCACAGATGCAGATTATGAATCTCGAGATTC-ATAATCTGCATCTGTGCTTTT3'). The control lentiviral

vector Mission shRNACtl encodes the puromycin resistance gene and an irrelevant shRNA sequence.

Transduction, transfection and infection

Jurkat T cells were transduced with one of the lentiviral vectors in the presence of 10 mM Hepes and 2 µg/mL DEAE to improve transduction. The stable Dlg1-depleted T cell lines were obtained using the following lentivirus-based vectors. The GFP-encoding lentiviral vectors pHIV-H1shRNADlg1 and pshRNACtl were used to obtain stably transduced Jurkat cells depleted of Dlg1 (referred to as Dlg1⁻) or control cell lines expressing endogenous Dlg1 (referred to as Dlg1⁺) respectively. After 3 h incubation at 37°C, complete fresh RPMI medium was added. Cells transduced with the GFP-encoding pHIV-H1shRNADlg1 or shRNACtl vectors were cultured for at least a week at 37°C before sorting the Dlg1⁺ and Dlg1⁻ cells for GFP positive cells by flow cytometry. Cells transduced with the puromycin-encoding Mission shRNA vectors were cultured for three days without selection and thereafter in RPMI supplemented with puromycin (0.75 mM/mL; Gibco).

The X4 NL4.3 and LAI.2 strains of HIV-1 were produced in 293T cells (1.5×10^6) transfected with 5 µg of pNL4.3 or LAI.2 proviral plasmids by the calcium phosphate technique and supernatants of cultured cells were collected 48 to 72 h post-transfection. For the production of HIV-1 in 293T cells depleted of Dlg1 by siRNA, two successive transfections were performed on 1.5×10^6 cells. The first transfection was with 20 nM siRNA and the second one 24 h later, with the same amount of siRNA together with 5 µg of LAI.2 proviral plasmid. Viruses were then filtered through a 0.45 µm pore-size filter and assayed for p24 content with the ELISA INNOTEST HIV Antigen mAb (INGEN). T cell lines were infected with HIV-1 NL4.3 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.005 to 0.05 in small volumes (100 to 500 µL) of RPMI medium containing 10 mM Hepes and 2 µg/mL DEAE to improve viral adhesion. RPMI alone was used for infections in which the properties of viral particles produced by Dlg1⁺ or Dlg1⁻ cells were compared. After 2 h incubation at 37°C the viral inoculum was washed off with complete RPMI medium and the cells were maintained in culture at 37°C.

Kinetics of infection were followed by determining the fraction of HIV-1-infected cells in the T cell cultures measuring intracellular Gag by flow cytometry. Cells were fixed, permeabilized (as described for immunofluorescence) and stained with the anti-HIV-p24 KC57-PE mAb which recognizes the 55, 39, 33 and 24 kDa proteins of the core of HIV-1.

Single cycle pseudotyped virions were produced in 293T cells by co-transfecting, as described above, 5 µg of the luciferase-expressing vector pNLuc with 0.5, 0.75 or 1 µg of the HIV-1 envelope-expressing vector pIIINL4env or with 50 ng of the plasmid encoding the *Vesicular stomatitis virus* glycoprotein G (VSV-G). The pseudotyped virions were normalized for p24 and used to infect Dlg1⁺ or Dlg1⁻ Jurkat T cells. A range of viral input from 100 to 1000 ng of p24 was used to infect Dlg1⁺ and Dlg1⁻ Jurkat T cells as described above. Two dpi, the cells were lysed and luciferase activity was determined.

Quantification of HIV-1 total DNA

HIV-1 NL4.3 and LAI.2 viral stocks produced by cells expressing or not Dlg1 were treated with 3 IU of Dnase I (Qiagen) per µg of p24 for 1 h at 37°C before infection of 2×10^6 Jurkat cells in RPMI as described above. Cells were harvested 6 h later, washed three times in PBS (Gibco) and DNA was extracted using the QIAamp Blood DNA minikit (Qiagen). Quantification of viral DNA was performed in triplicate by quantitative PCR on a

Light Cycler 480 instrument (Roche Diagnostics, Meylan, France) using the Light Cycler 480 probe master (Roche Diagnostics) and the previously described HIV-1-specific primers and fluorogenic probes [35]. The forward primer MH531 anneals to the U5 region of the LTR (5'TGTGTGCCCCGTCTGTTGTGT3'), the reverse primer MH532-NL4.3 anneals to the upstream region of *gag* (5'GAGTCCTGCGTCGAGAGATC3') and the fluorogenic probes for these region are MHFL: 5'CCCTCAGACCCCTTTTGTAGT-CAGTGTGGAA-fluorescein and MHLC: 5'LC640TCTCTAG-CAGTGGCGCCCCGAACAG-PH. After an initial denaturation step (95°C for 8 min), 40 cycles consisting of 95°C for 10 s, 60°C for 10 s and 72°C for 6 s were performed. The second-derivative-maximum method provided by the Light Cycler SW 1.5 quantification software was used (Roche Diagnostics). The reference gene was human β-globin, amplified using the Light Cycler control kit DNA (Roche Diagnostics) that includes human genomic DNA and β-globin-specific primers and probes. Viral DNA quantification was determined using the ΔC_q method [36]. For each HIV-1 DNA and globin, the mean C_q of all samples was used to calculate the ΔC_q. The calculations performed for all the values were: the ΔC_q = the mean C_q – each C_q, the RQ = Efficiency of gene's amplification^{ΔC_q} and the normalized NRQ = RQ HIV-1 DNA/RQ globin.

Infectivity tests and particle analysis

Supernatants of Dlg1⁺ and Dlg1⁻ Jurkat T cells infected with HIV NL4.3 at a multiplicity of infection (MOI) of 0.05 were collected 7 days post-infection (dpi). Equal amounts of virus (from 1 to 5 ng) determined either by p24 content or by reverse transcriptase (RT) activity (quantified by the Quan-T-RT assay system, Amersham Bioscience) were used to infect HeLa P4.2 reporter cells. After 36 h of incubation, the cells were lysed and β-galactosidase production was assessed by a colorimetric assay based on cleavage of chlorophenol red-β-D-galactopyranoside (CPRG) as described previously [18]. The mean optical density value of four experiments obtained from extracts of cells infected with viruses from Dlg1⁺ Jurkat T cells was taken as 100%.

Single-cycle infectivity analyses were performed by using HIV-1 pseudotypes obtained with the pNLuc [31] vector together with the HIV-1 Env expression vector pIIINL4env [32] to determine the efficiency of early steps of the HIV-1 life cycle in cells expressing or not Dlg1. Cells were lysed 48 h post-infection and luciferase activity was measured using the luciferase assay reporter kit (Promega) according to the manufacturer's instructions.

Purified virions were obtained from supernatants of infected cultures, filtered (0.45 µm) and ultracentrifuged through a 25% sucrose cushion in TNE buffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 1 mM EDTA). Ultracentrifugation was performed at 150000 X g for 1 h at 4°C in a Beckman SW41 Ti rotor and viral pellets were resuspended in 30 µL lysis buffer (20 mM Tris-HCl pH 8, 0.2 mM EGTA, 120 mM NaCl, 0.2 mM NaF, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% NP40, and complete protease inhibitors; Roche Applied Science) before immunoblotting.

Determination of viral cholesterol content

HIV-1 LAI.2 virions were recovered, ultracentrifuged and solubilized as described above, and were normalized according to their p24 content to determine their cholesterol content using the Amplex Red Cholesterol Assay Kit (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The media from uninfected cells were prepared the same way as the virions and were used as controls in the cholesterol assay to evaluate contaminating cholesterol not associated to virions.

Co-culture assays

To quantify HIV-1 transfer from infected to target cells an adaptation of the co-culture assay reported by Sourisseau *et al.* [2] was used. Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells were infected with HIV-1 NL4.3 at an MOI of 0.005 or 0.05. Once the cultures had reached a minimum of 20% infection, infected (Gag+/GFP+) cells were co-cultivated at a 1:1 ratio for up to 17 h with target uninfected Jurkat cells (GFP-) or with primary CD4+ T cells stained with cell trace violet (Invitrogen). Samples were collected and analyzed for Gag transfer into target cells at different time points of the co-culture by intracellular Gag staining with KC57-PE mAb followed by flow cytometry analysis (Canto 2 cytometer or FC-500 Cytomics).

This co-culture test was also adapted to measure productive HIV-1 transmission into the target cells. Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells infected as described above were co-cultivated at a ratio of 1:1 with uninfected Jurkat LTR-luciferase cells (1G5 cells) for 24 h. Luciferase activity was then measured in target 1G5 cells after lysis using the Promega luciferase kit, according to the manufacturer's instructions.

Immunofluorescence and laser scanning confocal microscopy

HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells, 5 to 7 dpi when cultures showed at least 50% Gag positive cells were allowed to form contacts. Infected cells (500 000 cells) were mixed at a 1:1 ratio with target uninfected primary CD4+ T cells and deposited for an hour at 37°C on poly-L-Lysine-coated coverslips to allow contact formation. For intracellular staining, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, permeabilized with methanol and washed with PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween 20. The cells were fixed and permeabilized to label internal Gag, Dlg1, and CD4 (with the blocking antibody MAB379) after VS formation. The cells were then incubated 40 min at room temperature with the primary antibodies anti-p24, anti-PSD-95 or anti-CD4 diluted in PBS buffer containing 2% BSA and 0.1% Tween 20. Primary antibodies were detected with Cy3-, or Cy5-conjugated goat anti-mouse, and anti-rabbit secondary antibodies. Monosynapses were defined as single cell-to-cell contacts presenting enrichment of Gag on the infected cell and co-localization with CD4 on the CD4+ target cell at sites of contact. Polysynapses were defined as contacts between a single effector cell and multiple target cells.

For the visualization of MTOC polarization, IS conjugates were formed between Jurkat and APC (Raji B) cells. Phosphotyrosine accumulation at the interface between the two cells was used as a marker of a productive IS contact that has led to TCR activation and to activation of the downstream signaling cascade. Centrin was used simultaneously to localize the MTOC. APCs were pulsed with 200 ng/mL superantigen in serum-free RPMI 1640 and plated on coverslips for 30 min at 37°C. Superantigen was a mix of recombinant staphylococcal enterotoxin E, A, B, and C3 (Toxin Technology). Dlg1+ or Dlg1- Jurkat cells were loaded with Hoechst and added to the APCs for 14 min at 37°C to allow conjugate formation. Cells were fixed with 2% paraformaldehyde for 10 min at room temperature and washed with PBS containing 0.5% BSA and 0.1% saponin. The cells were then incubated with the primary antibodies anti-pericentrin and anti-phosphotyrosine for 30 min. Primary antibodies were detected with Alexa 568-, or Alexa 647-conjugated donkey anti-mouse or donkey anti-rabbit secondary antibodies.

Coverslips were mounted with Fluorsave reagent (Calbiochem) or the ProLong anti-fade kit solution (Invitrogen). Laser scanning microscopy was performed using a Leica TCS resonant scanner multi-photon (spinning disc) or a Leica TCS SP2 AOBs, with the 63X objectives. Epifluorescence images were acquired with a

Nikon TE2000, a CCD 16 Bits camera (Cascade, Princeton Instruments) and the Metamorph software (Molecular Devices). Images were analyzed using ImageJ software (Wayne Rasband; NIH). For quantitative image analysis of MTOC polarization at the IS, a conjugate was defined as a contact between a Jurkat and an APC with phosphotyrosine accumulation at the IS. The ratio between the distance from the MTOC to the IS and the cell diameter were calculated. The MTOC was considered relocated if the ratio was inferior to the threshold value of 20%.

Electron Microscopy

Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected Jurkat cells (3×10^6) six or seven days post-infection, when the cultures showed at least 60% Gag+ cells, were fixed for 4 h in a solution containing 2% paraformaldehyde, 2.5% glutaraldehyde and 2.5% sucrose. The cells were washed in PBS and centrifuged at 20000 X g. Subsequently, the cellular pellet was washed three times in 0.1 M sodium phosphate buffer pH 7.0, incubated 30 min at 4°C in osmic acid (1% in sodium phosphate buffer) and dehydrated in graded ethanol solutions (2x10 min in 70%, 2x10 min in 90% and 2x10 min in 100% ethanol). The cell pellet was then incubated 2x1 min in propylene oxide, 10 min in 50% Epon-50% propylene oxide, then embedded in Epon and incubated for polymerization 24 h at 60°C. Finally, 90 nm sections were cut on a Reichert Ultracut S and layed on a grid for 10 min of staining with 2% uranyl acetate and 4 min with lead citrate at room temperature. The observations were performed with a JEOL 1011 transmission electron microscope and the images recorded at 80 kv with a GATAN Erlangshen camera 1000. For quantifications a total of 5300 Dlg1+ Jurkat T cells and of 6500 Dlg1- Jurkat T cells were observed.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Mann Whitney and χ^2 tests. Statistical significance was defined for P values <0.05.

Results

Kinetics of HIV-1 replication in Dlg1-depleted T cells

To establish an experimental system that allows kinetic studies of HIV-1 infection in a natural host cell of the virus, Jurkat T cells were stably depleted of Dlg1 and infected by HIV-1. This system is physiologically more relevant than the one used previously with adherent 293T cells depleted of Dlg1 by siRNA and transfected with a proviral HIV-1 plasmid [18]. The stable Dlg1-depleted Jurkat T cell lines (Dlg1-) were obtained using two lentivirus-based vectors that target two different sequences in Dlg1 indicated in the materials and methods section. The depletion of Dlg1 obtained in Dlg1- Jurkat T cells using the GFP-encoding pHIV-H1shRNA lentivirus was 85% compared to Dlg1 control (Dlg1+) Jurkat T cell levels (Figure 1A). The depletion of Dlg1 obtained using the puromycin-encoding Mission shRNADlg1 lentivirus in Dlg1- Jurkat T cells was 95% compared to control Dlg1+ Jurkat T cell levels (Figure 1A).

Given the key role of Dlg1 in clustering protein complexes at the plasma membrane, in T cell signaling and in IS formation, the Dlg1- T cells were characterized to determine if the absence of Dlg1 affects the expression of surface molecules that are particularly important for T cell function and for HIV infection. The surface level of receptors that are components of the IS (CD3, LFA-1, ICAM-1), or the VS (CD4, LFA-1) and the viral receptor/co-receptor (CD4, CXCR4) were determined by flow cytometry after staining with specific antibodies. The surface levels of CD3,

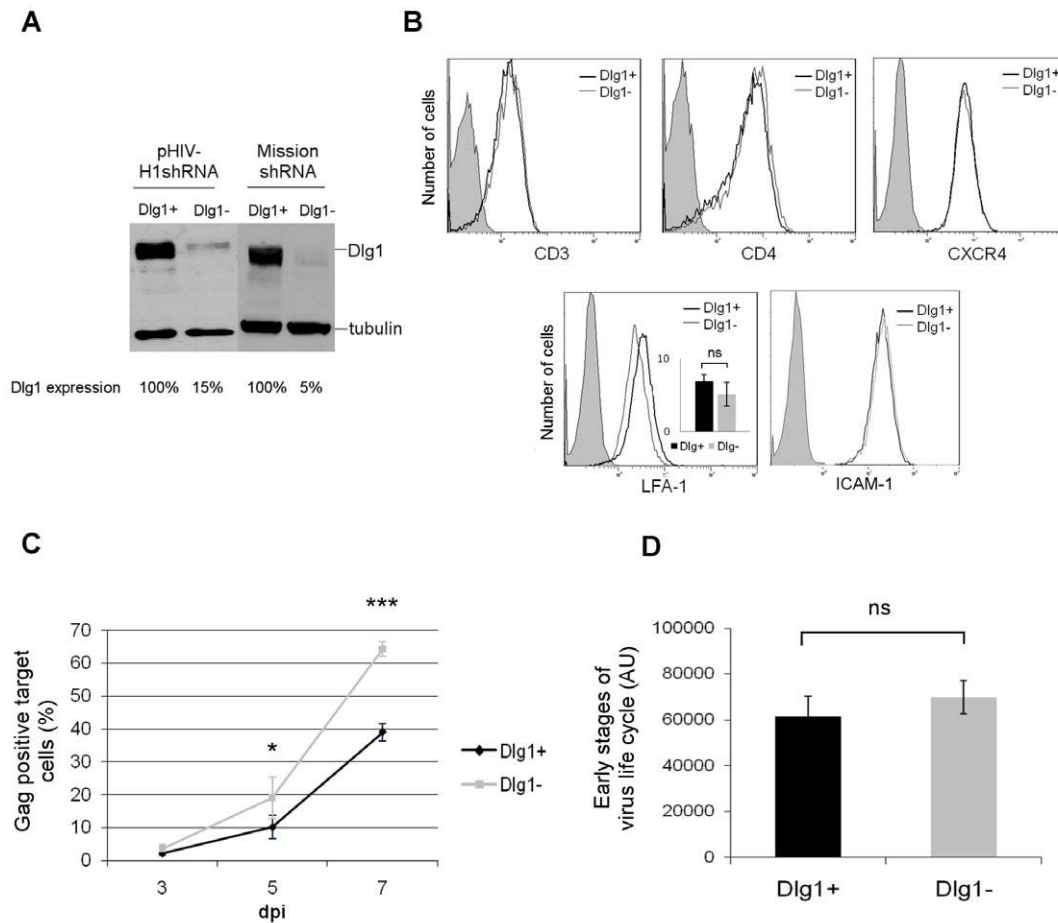


Figure 1. HIV-1 replication is enhanced in Dlg1-depleted T cells. **A.** Dlg1 expression in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells obtained with two lentivirus-based shRNA vectors. The stable Dlg1-depleted Jurkat T cell lines (Dlg1-) were obtained using two lentivirus-based vectors that target two different sequences on Dlg1. Control Jurkat T cell lines (Dlg1+) were obtained using the control vectors. T cells transduced with the GFP-encoding vectors (pHIV-H1shRNADlg1 or pHIV-H1shRNA Ctrl) or with the puromycin-encoding vectors (Mission shRNADlg1 or Mission shRNA Ctrl) were analyzed by western blot, and Dlg1 levels were quantified using ImageJ software. **B.** Expression of surface molecules in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells. Cells were labeled with antibodies against CD3, CD4, CXCR4, LFA-1 and ICAM-1 and analyzed by flow cytometry. The data are representative of three independent experiments performed in triplicates. For LFA-1 the mean values of three independent experiments performed in triplicates is also presented. **C.** HIV-1 replication in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with the NL4.3 HIV strain. Viral replication was measured by determining the fraction of HIV-1-infected cells in the two cultures by intracellular Gag labeling and flow cytometry. Cells were labeled with the anti-HIV-p24 mAb KC57-PE, 3, 5 and 7 dpi. The data are the means of four independent experiments performed in duplicate. $P=0.031$ for 5 dpi. $P<0.0001$ for 7 dpi. **D.** Efficiency of early steps of the HIV-1 life cycle in cells expressing or not Dlg1. Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells were infected with the single cycle pNL4.3-derived pNLuc vector pseudotyped with the HIV-1 Env expression vector pIIIINL4env and luciferase activity was measured 48 h post infection. The data are the means of three independent experiments performed in triplicate, using 100 ng to 1000 ng of p24 of virus produced by 293T cells co-transfected with 5 μ g of pNLuc and 0.5, 0.75 or 1 μ g of pIIIINL4env. $P=0.59$. Error bars represent standard error of the mean (SEM). ns = no statistically significant difference. *, $P<0.05$. ***, $P<0.001$. AU = arbitrary units. doi:10.1371/journal.pone.0030130.g001

CD4, CXCR4, LFA-1 and ICAM-1 were similar in Dlg1- and Dlg1+ cells (Figure 1B), indicating that Dlg1 knock down does not have a general deleterious effect.

The course of HIV-1 replication during infection was followed in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with the NL4.3 HIV strain by measuring intracellular Gag by flow cytometry. The propagation of the virus was more efficient in Dlg1- cells, with 40% more infected cells seven days-post infection (dpi), indicating that Dlg1 affects the replication of HIV-1 in T cells (Figure 1C).

We wondered whether the increase in HIV-1 replication was due to an effect of Dlg1 in either early or late steps of the virus life cycle. To this end, the efficiency of early steps of the HIV-1 life cycle in cells expressing or not Dlg1 was determined by using single-cycle HIV-1 infectivity assays in the absence of virus spread. The pNL4.3-derived pNLuc vector, which is Envelope and Nef

minus and expresses luciferase following infection [31], together with the HIV-1 Env expression vector pIIIINL4env [32] were used to produce pseudotyped viruses. Within the range of viral inputs tested from 100 to 1000 ng of p24, no difference in the levels of luciferase activity was observed between cells expressing or not Dlg1 (Figure 1D). These results suggest that Dlg1 does not interfere with early steps of HIV-1 life cycle, therefore it may affect late steps of the virus life cycle such as virus assembly, budding, cell-free virus transmission or cell-to-cell transmission.

Virological synapse formation in Dlg1-depleted T cells

The Dlg1- T cells were functionally characterized by looking at the MTOC polarization during IS formation between T cells and APCs. In T cells, MTOC polarization to the plasma membrane modulates IS formation and T cell signaling [37,38] and Dlg1

silencing reduced MTOC positioning at the IS [25]. Phosphotyrosine accumulation at the interface between the conjugated cells was used as a marker of a productive IS contact that has led to TCR activation and to activation of the downstream signaling cascade. Centrin was visualized simultaneously to localize the MTOC. Figure 2A shows results obtained with the pHIV-H1shRNADlg1 and pHIV-H1shRNACtl vectors expressing the GFP. As expected, MTOC polarization towards the plasma membrane during IS formation was reduced in Dlg1- cells. An example of a polarized MTOC in Dlg1+ cells and of a non-polarized MTOC in Dlg1- cells are depicted (Figure 2A left panel). The quantification of MTOC polarization in Dlg1+ and Dlg1- cells (Figure 2A right panel) shows a statistically significant reduction of MTOC polarization towards the plasma membrane during IS formation in Dlg1- cells. Therefore, these cells can be used to further study the possible role of Dlg1 in VS formation and virus transmission during HIV-1 infection.

To determine the cellular localization of Gag in the presence and absence of Dlg1, HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- T cells were immunostained for Dlg1 and Gag. Dlg1 is present at the cellular periphery and particularly at cell contacts in Dlg1+ cells and no Dlg1 was observed in Dlg1- cells (Figure 2B). Gag is at the cellular periphery and accumulates at cell contacts between infected and target cells in both Dlg1+ and Dlg1- cells as indicated by white arrows (Figure 2B and C).

Jolly *et al.* [7] described HIV-1-induced VS formation as the coenrichment of the viral Gag and Env proteins on the infected cell and of CD4 on the primary target cell at sites of cell-to-cell contact. Monosynapses were scored here as single cell-to-cell contacts presenting enrichment of Gag on the HIV-1-infected cell and colocalization with CD4 on the target cell at sites of contact. Polysynapses were defined as contacts between a single effector cell and multiple target cells. Using these criteria, virological monosynapses and polysynapses formed between donor Dlg1+ or Dlg1- cells and Jurkat target T cells appeared similar (data not shown). Since the mAb used for these studies is a CD4 blocking mAb, staining of permeabilized CD4+ primary cells allowed the detection of CD4 not bound to gp120 and reduction of CD4 staining in the target cell at the site of contact may be observed. Similar results were obtained for monosynapses and polysynapses formed between donor Dlg1+ or Dlg1- cells and primary CD4+ target T cells (Figure 2C). As indicated by the white arrows, Gag and CD4 colocalized at the VS (Figure 2C top panel). After one hour of co-culture, Gag puncta were visible on the target primary CD4+ cells both on monosynapses and on polysynapses with either Dlg1+ or Dlg1- cells. The quantification of cellular contacts, monosynapses and polysynapses of three independent experiments revealed that Dlg1- T cells were not impaired in HIV-1-induced VS formation (Figure 2C bottom panel).

Together, these results show that in HIV-1-infected T cells the absence of the scaffold protein Dlg1 does not affect Gag localization to VS, cell-to-cell contact or VS formation in both monosynapses and polysynapses.

HIV-1 cell-to-cell transmission in Dlg1-depleted T cells

We further studied whether Dlg1 could affect HIV-1 cell-to-cell transmission. It has been largely documented that due to faster transmission kinetics of cell-to-cell spread than cell-free virus transmission, 24 h of co-culture is the time frame in which spread of HIV-1 occurs by direct cell-to-cell transmission rather than by free virus transmission [1,2,39,40]. Here, an equal number of infected cells and target cells was mixed and co-cultured for up to 17 h. Virus transfer from infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells to target Jurkat or primary CD4+ T cells was quantified by

measuring intracellular Gag in target cells by flow cytometry at different times. Gag transfer from Jurkat donor to Jurkat target T cells was detected within 4 h of co-culture, increasing approximately fivefold by 17 h. At 17 h of co-culture no significant difference was observed in the number of infected Jurkat T cell targets, whether the donor cells were Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells (Figure 3A). Similar assays were performed with HIV-1-infected Jurkat donor T cells and Dlg1+ or Dlg1- Jurkat targets T cells and no difference was found in the number of infected Jurkat T cell targets, whether the target cells were Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells (data not shown).

Co-culture assays were also performed with cell trace violet-labeled primary CD4+ T cells as targets and no difference was found in the number of primary CD4+ target T cells infected whether the donor cells were Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells (Figure 3B).

To determine the level of viral transfer that results in effective viral transmission, Jurkat-LTR-luciferase cells (1G5 cells) were used as target cells. This cell line allows the quantification of effective viral transmission by measuring the luciferase activity. Similar luciferase activity was observed in 1G5 cells after co-culture whether the donor cells were Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells (Figure 3C).

To evaluate the contribution of cell-free virus transmission during the co-culture, supernatants of the different co-cultures were further incubated under the same experimental conditions for an additional 24 h period with target cells either primary CD4+, Jurkat or 1G5 cells. No infection of target cells was detected (not shown), confirming that our experimental conditions allowed us to study cell-to-cell virus transmission. The results of the different co-culture assays show that Dlg1 does not affect HIV-1 cell-to-cell transfer or effective virus transmission in T cell lines or primary T cells. Taken together, our data indicate that the replication enhancement observed in Dlg1- T cells (Figure 1C) is not the result of Dlg1 effects in cell-to-cell contact, VS formation or cell-to-cell spread of HIV-1.

Levels of HIV-1 Gag and Env proteins in Dlg1-depleted T cells and in particles produced

The role of Dlg1 in cell-free virus transmission was further examined by studying the late steps of the viral life cycle such as virus yield and infectivity. HIV-1 yield during infection was followed in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 by measuring by ELISA at different times the levels of p24 released in the supernatants. Virus yield was increased at 5 and 7 dpi in the Dlg1- Jurkat T cell culture compared to the Dlg1+ Jurkat T cell culture (Figure 4A).

The infectivity of viral particles produced by Dlg1- and Dlg1+ T cells was determined by their capacity to infect HeLa CD4+ indicator target cells. HIV-1 particles produced by Dlg1- cells 7 dpi showed a fourfold increase in infectivity compared to the particles produced by the Dlg1+ cells (Figure 4B). This study performed using stably Dlg1-depleted T cells infected with HIV-1 confirmed previous studies performed with adherent 293T cells depleted of Dlg1 by siRNA and transfected with a proviral HIV-1 plasmid [18]. Collectively, the results of virus yield and infectivity indicate that the enhanced HIV-1 replication observed in Dlg1- T cells (Figure 1C) results from a combination of increased yield and Dlg1 modulation of cell-free virus transmission.

To determine if the increased infectivity of viral particles produced by Dlg1- cells results from a higher incorporation of Env into viral particles, western blot analyses were performed on protein extracts of HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- cells and of the viruses they produced. Figure 4C summarizes the results of

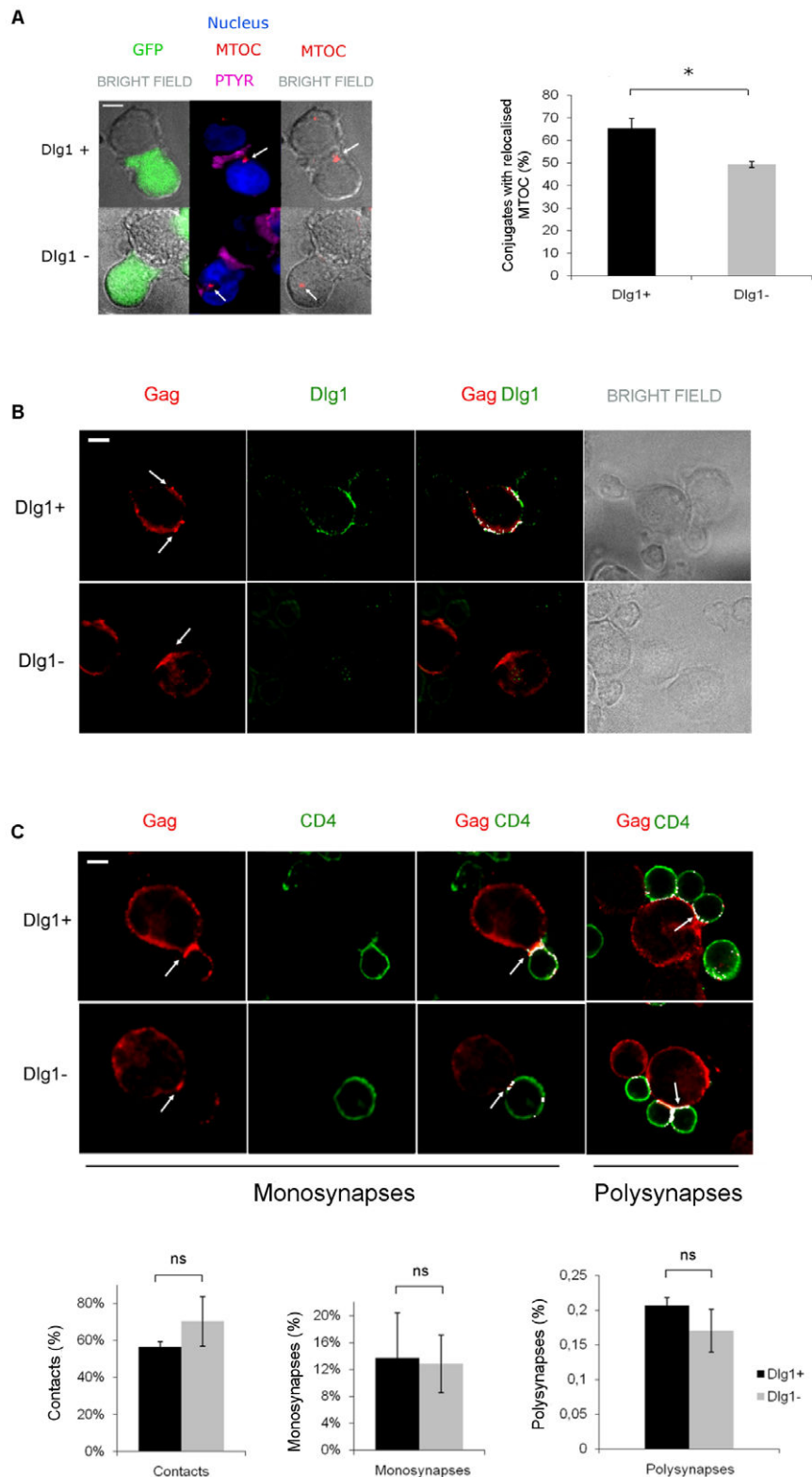


Figure 2. Dlg1 depletion affects IS but not VS formation in T cells. A. MTOC polarization toward the nascent IS in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells. Left panel: IS conjugates were formed between Jurkat and APC (Raji B) cells. Phosphotyrosine accumulation at the interface between two contacting cells served as marker of a productive IS contact that led to TCR activation and to activation of the downstream signaling cascade. Centrin was visualized simultaneously to localize the MTOC. A polarized MTOC in a Dlg1+ T cell and an unpolarized MTOC in a Dlg1- T cell are seen. The nuclei of Jurkat T cells are shown in blue, the MTOCs are shown in red and indicated by a white arrow. The phosphotyrosine (PTYR) is shown in magenta. The results shown were obtained with the pHIV-H1shRNADlg1 and pHIV-H1shRNACtl vectors expressing the GFP. Similar results were obtained with cells transduced with the lentivirus vectors pHIV-H1shRNADlg1 and Mission shRNADlg1. Right panel: **Quantification of MTOC polarization** observed in Dlg1+ (n = 131) and Dlg1- (n = 151) T cells in four independent experiments. P = 0.029. **B. Cellular localization of Gag in**

the presence and absence of Dlg1. Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells were immunostained for Gag and for Dlg1. White arrows indicate Gag accumulation at the VS. The images shown are representative of three independent experiments. **C. VS formation in Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells.** Upper panel: HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells were mixed with an equal number of non-infected primary CD4+ target cells and were allowed to establish contacts on poly-L-lysine-coated coverslips for 1 h at 37°C. The cells were fixed, permeabilized, immunostained for Gag and CD4 and analyzed by confocal microscopy. Monosynapses were defined as contacts between a single effector and a single target cell presenting colocalization (in white) of Gag on the infected cell and of CD4 on the CD4+ target cell at sites of contact. Polysynapses were defined as contacts between a single effector cell and multiple target cells. Lower panel: Quantification of cellular contacts, monosynapses and polysynapses between HIV-1-infected Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells and CD4+ target cells. A total of 1603 Dlg1+ control T cells and 1616 Dlg1- T cells were counted. The data are the means of 3 independent experiments. $P=0.7$ for contacts. $P=1.0$ for monosynapses. $P=1.0$ for polysynapses. Error bars represent SEM. ns = no statistically significant difference. *, $P<0.05$. Scale bar = 5 μm . doi:10.1371/journal.pone.0030130.g002

four independent experiments. The amount of intracellular Env in Dlg1- cells compared to level in Dlg1+ cells was two to sixfold higher (gp160+gp120 normalized with respect to Gag). Whereas the amount of virus-associated Env in the viruses produced by Dlg1- T cells compared to that in the virus produced by Dlg1+ cells was half-fold lower to threefold higher (gp120 normalized with respect to Gag). Infectivity of viruses produced by Dlg1- cells was increased from two to sixfold while the extinction of Dlg1 in these cells was from 50 to 80%. The results of experiment 4 (Figure 4C and D) show that Dlg1 depletion did not affect Gag production in Dlg1- T cells (Pr55Gag and p24; Figure 4D left panel) and that while a sixfold increase in intracellular Env was observed in

Dlg1- T cells, the viruses produced by these cells showed 50% reduction of virus-associated Env and a fivefold increase in infectivity as compared to viruses produced by Dlg1+ T cells. In summary, Dlg1 depletion in T cells does not affect Gag synthesis but enhances cell-associated Env and virus infectivity. On the other hand, the changes observed on virus-associated Env did not always correlate with enhanced infectivity. To determine if the Env level at the plasma membrane is affected by Dlg1, the cell-surface level of HIV-1 Env was quantified by flow cytometry. No difference in Env cell-surface levels in HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells was observed (Figure 4E). Consequently, viral particles budding at the plasma membrane of Dlg1+ and

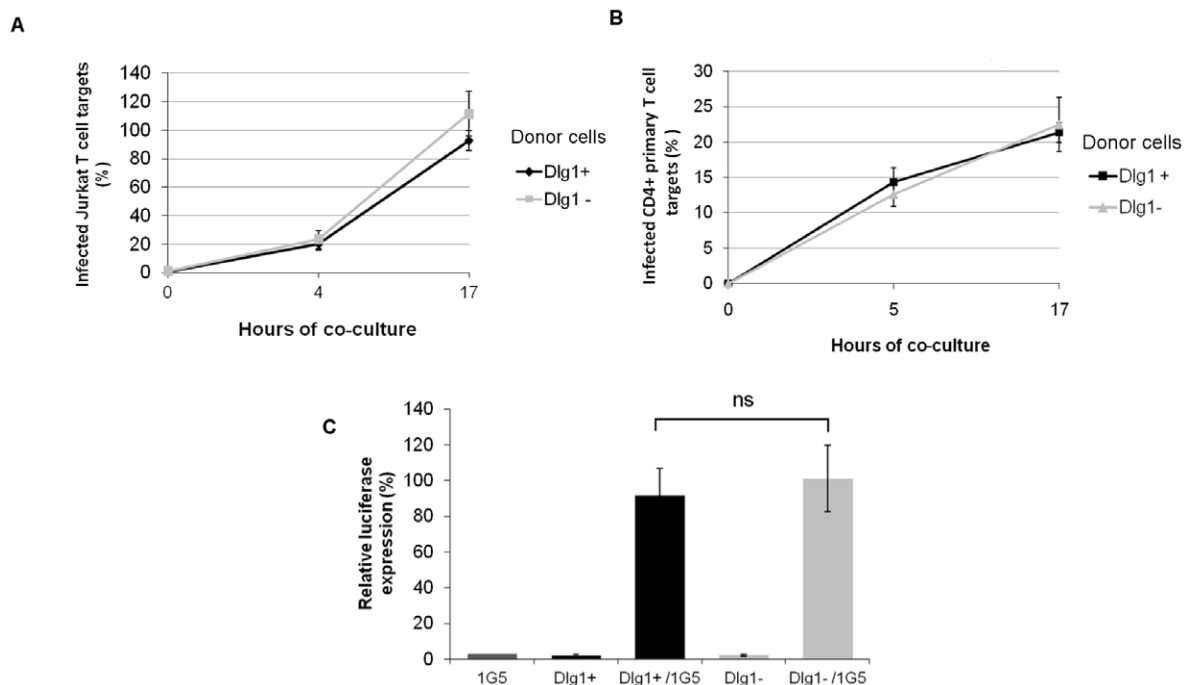


Figure 3. HIV-1 cell-to-cell transmission is not affected in Dlg1-depleted T cells. A. Co-culture of HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat and target Jurkat Dlg+ T cells. Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 NL4.3 were co-cultured with target Jurkat cells. When a minimum level of 20% infection was reached for both Dlg1+ and Dlg1- cells, equal numbers of infected and target cells were mixed and co-cultured for up to 17 h. At different times after infection the cells were analyzed by flow cytometry to determine the percentage of infected target cells. Results are mean relative values of six independent experiments performed in duplicate. For each experiment the values were normalized taking as 100% the value obtained for one of the duplicates of Dlg1+ cells at 17h. $P=0.26$ at 17 h. Assays were performed with cells transduced with the two lentivirus vectors (pHIV-H1shRNA and Mission shRNA) and similar results were obtained. The results obtained with the GFP-encoding vectors are presented. **B. Co-culture of HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat and target CD4+ primary T cells.** Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 NL4.3 were co-cultured with primary CD4+ T cells previously labeled with cell trace violet. Infected and target cells were co-cultured at a 1:1 ratio for up to 17 h and analyzed by flow cytometry. The data are average values of three independent experiments performed in duplicate. $P=0.31$. **C. Co-culture of HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat and target Jurkat-LTR-luciferase T cells.** Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 NL4.3 were co-cultured with Jurkat-LTR-luciferase cells (1G5 cells). Infected and target cells were co-cultured at a 1:1 ratio for up to 24 h and analyzed for luciferase activity. The data are average relative values of three independent experiments performed in duplicate. The values were normalized taking the values obtained for 1G5 cells at 24 h as background for each experiment. $P=0.7$. Error bars represent SEM. ns = no statistically significant difference. doi:10.1371/journal.pone.0030130.g003

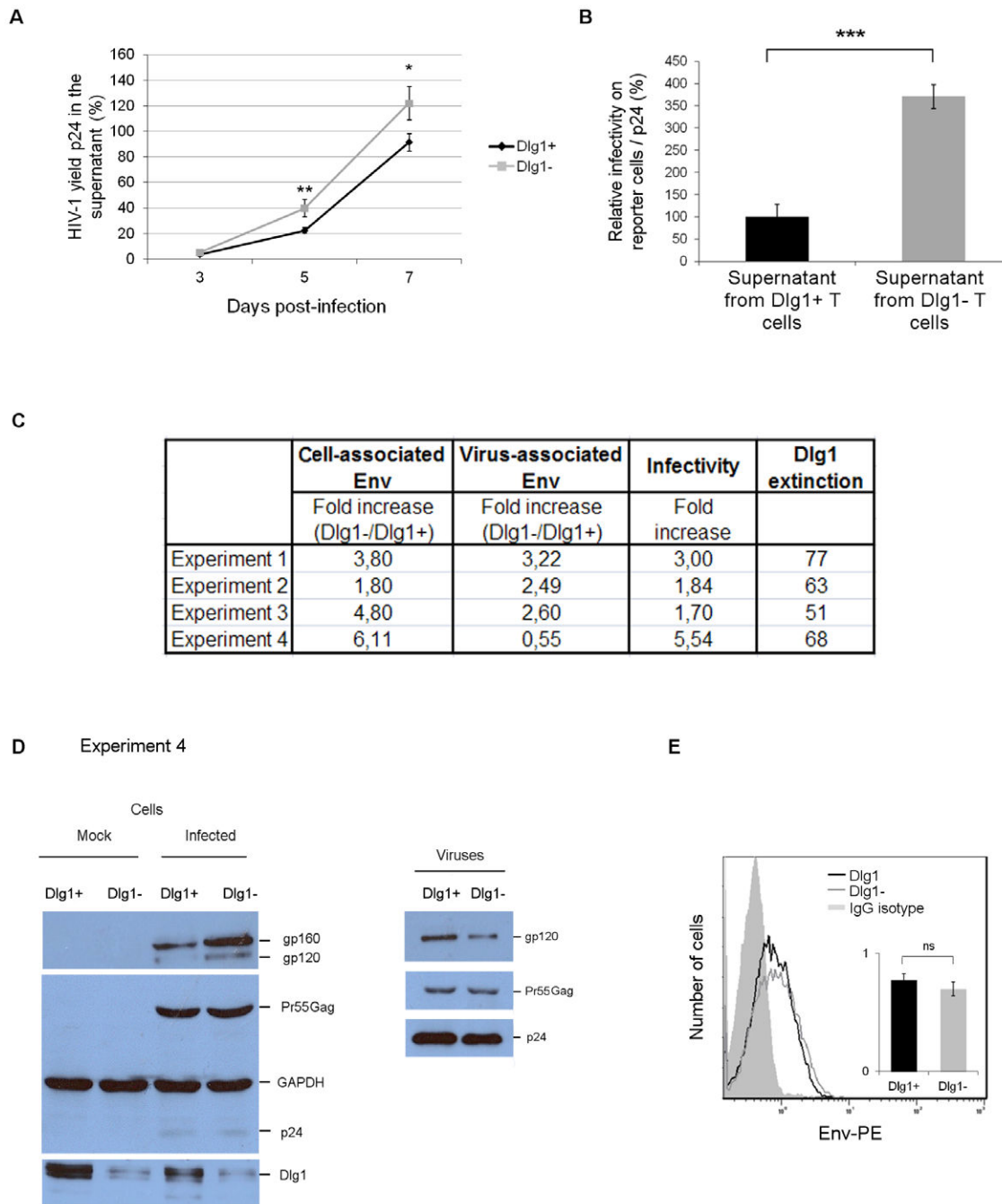


Figure 4. The levels of HIV-1 Env incorporated into viral particles produced by Dlg1-depleted T cells do not correlate with increased infectivity. **A. HIV-1 yield of Dlg1+ and Dlg1- T cells.** Supernatants were collected during the course of infection, filtered and the p24 content was measured by ELISA. The values were normalized for protein content of extracts of cultured cells. The data are the mean values of three independent experiments each carried out in duplicate. For each experiment the values were normalized taking as 100% the value obtained for one of the duplicates of Dlg1+ cells at 7 dpi. $P=0.007$ for 5 dpi. $P=0.02$ for 7 dpi. **B. Infectivity of HIV-1 particles produced by Dlg1+ and Dlg1- T cells.** Viral supernatants of Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 NL4.3 were collected 7 dpi, filtered and used to infect indicator HeLa P4.2 reporter cells. Equal amounts of virus determined by p24 quantification were used. β -galactosidase production was assessed by a colorimetric assay based on cleavage of CPRG. The data are means of four independent experiments carried out in triplicate. $P=0.0004$. **C. Summary of quantification of cell-associated Env in Dlg1+ and Dlg1- cells and of virus-associated Env in progeny viruses.** The cell-associated Env levels were estimated from the intensity of the signals on western blots and calculated as gp160+gp120/Gag in cell lysates. Equal amounts of total protein in lysates of Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected cells recovered 5 dpi were analyzed using antibodies against HIV-1 Gag and Env. The virus-associated Env levels (gp120) were estimated from the intensity of the signals on the western blots; equal amounts of p24 of purified viruses from supernatants of Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected cells were analyzed using antibodies against HIV-1 Gag and Env. The infectivity of these viruses was determined as described in B. The data are from four independent experiments. **D. Western blot analysis of protein extracts of Dlg1+ and Dlg1- cells and of purified viruses produced.** Results of experiment 4 are shown. Left panel: equal amounts of total protein in lysates of Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected cells recovered 5 dpi were analyzed using antibodies against HIV-1 Gag and Env, against Dlg1 and against GAPDH. Right panel: equal amounts of p24 of purified viruses from supernatants of Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected cells were analyzed using antibodies against

HIV-1 Gag and Env. **E. Cell-surface level of HIV-1 Env on Dlg1+ and Dlg1- HIV-1-infected T cells.** The cell-surface level of HIV-1 Env was determined by flow cytometry analysis using the anti-Env 5F7 antibodies. HIV-1-infected Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells were analyzed 5 dpi. Two independent experiments were carried out in duplicate. Error bars represent SEM. ns = no statistically significant difference. *, $P < 0.05$. **, $P < 0.01$. ***, $P < 0.001$.

doi:10.1371/journal.pone.0030130.g004

Dlg1- cells where Env levels are similar may incorporate similar levels of Env. Collectively, the results indicate that the increase in infectivity of particles produced by Dlg1- T cells does not correlate with an increase in levels of Env incorporated in these particles and that therefore virus-associated Env level alone is not responsible for the observed increase in infectivity.

Subcellular distribution of HIV-1 particles in Dlg1-depleted T cells

In a previous study we observed by confocal microscopy that Gag and Env were relocalized to apparently internal compartments

in unconjugated Dlg1- T cells transfected with LAI.2 HIV-1-proviral clones [18]. To extend those studies with stably depleted Jurkat T cells infected with HIV-1, we examined by electron microscopy the subcellular distribution of viral particles in unconjugated cells. Cell cultures with a minimum of 60% infected cells were used for these experiments. Viral particles were seen in 6% of the cells by electron microscopy (i.e. in 10% of the infected cells). Viral particles budded exclusively from the plasma membrane in all virus-producing Dlg1+ Jurkat T cells as well as in 96% of Dlg1- Jurkat T cells (Figure 5A). Viral particles were seen in internal compartments in the remaining 4% of the virus-producing

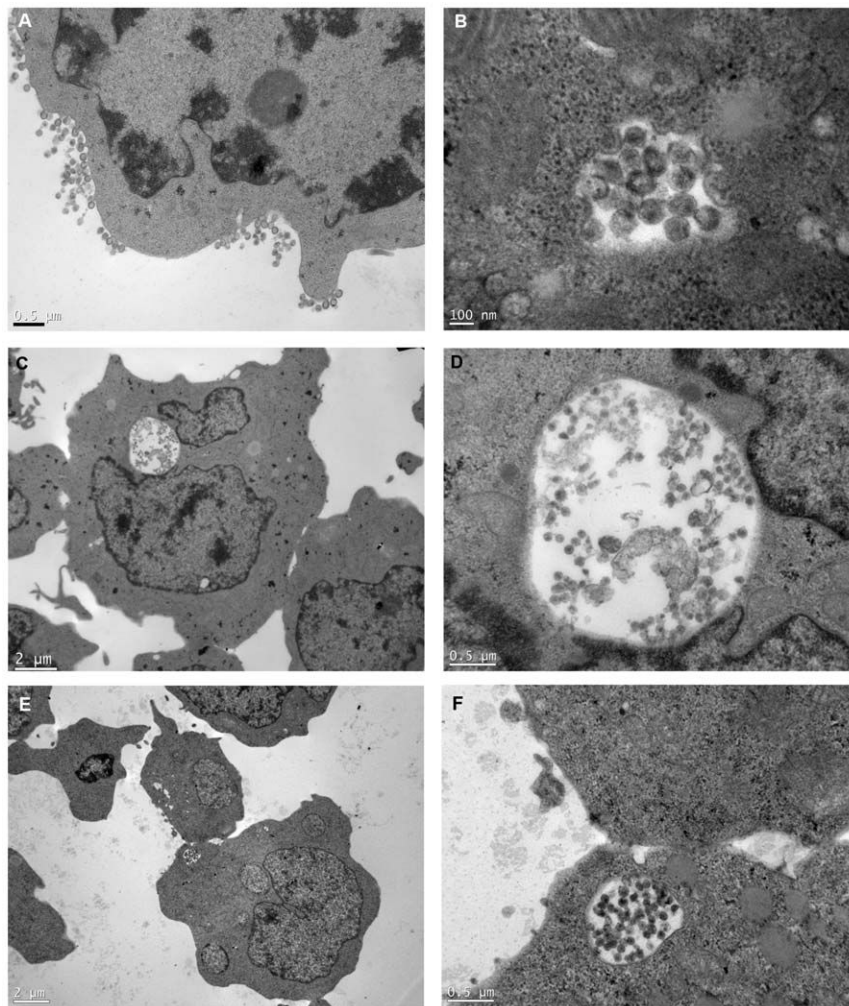


Figure 5. Budding of HIV-1 particles in Dlg1- Jurkat T cells occurs at the plasma membrane and in internal compartments. A. Budding of HIV-1 particles in Dlg1- Jurkat T cells from the plasma membrane. Dlg1+ and Dlg1- Jurkat T cells infected with HIV-1 were examined 6 dpi, when infection was about 60%, by electron microscopy in cells not forced to form conjugates. A total of 320 Dlg1+ Jurkat T cells (out of 5300) showing viral particles and of 392 Dlg1- Jurkat T cells (out of 6500) showing viral particles were counted. Budding from plasma membrane was identical in Dlg1+ and Dlg1- cells; the image presented is of a Dlg1- Jurkat T cell. Two independent experiments were performed with both NL4.3 and LAI.2 HIV-1. **B. Budding of HIV-1 particles in Dlg1- Jurkat T cells from internal compartments.** Cells were treated as above. Budding and mature particles are seen in an internal compartment in a Dlg1- Jurkat cell. **C and D. HIV-1 particles in internal compartments of Dlg1- Jurkat T cells.** Mature particles are seen in the enlargement in D. **E and F. HIV-1 particles in compartments near the plasma membrane of Dlg1- Jurkat T cells.** Mature particles are seen in the enlargement in F. Same magnification was used in C and E and in D and F. $P = 0.02$ for NL4.3. $P = 0.01$ for LAI.2 infected cells. Scale is 0.5 μm for A, D and F, 2 μm for C and E and 100 nm for B. doi:10.1371/journal.pone.0030130.g005

Dlg1- Jurkat T cells (Figure 5B to F). Interestingly, particles in the course of budding were observed in some of these compartments (Figure 5B). Two types of compartments were observed, large ones close to the nucleus (Figure 5C and D) and small ones near the plasma membrane (Figure 5E and F). The small ones may be invaginations of the plasma membrane, whereas the large ones are most likely internal compartments based on their size and localization inside the cell. Finally, 4% of virus producing cells of both Dlg1+ and Dlg1- cells showed small shallow invaginations (data not shown). No large deep invaginations were observed in any of the two types of cells. Similar results were obtained for Jurkat T cells infected with pNL4.3 and LAI.2 HIV-1. Statistical analyses using the chi2 test indicate that the presence of virus-containing internal compartments is significantly due to the absence of Dlg1 in the infected cells ($P=0.02$ for pNL4.3 and $P=0.01$ for LAI.2 infected cells). These electron microscopy studies show for the first time virus-containing internal compartments in acutely HIV-1-infected Dlg1- Jurkat T cells. They confirm our previous observations with confocal microscopy [18] and open the way for future characterization of the nature of the internal compartments

as well as the elucidation of the role of these compartments in HIV-1 trafficking in T cells.

Role of Dlg1 in cell-free virus transmission

To investigate at which step Dlg1 affects infectivity of cell-free virus, total viral DNA was determined by quantitative PCR of HIV-1 DNA, 6 h after infection of Jurkat cells with NL4.3 HIV-1 produced by Dlg1+ or Dlg1- cells. A fourfold accumulation of total viral DNA was observed in Jurkat cells infected with virus produced by Dlg1- cells compared to Jurkat cells infected with virus produced by Dlg1+ cells (Figure 6A). Similar results were obtained when infections were performed with LAI.2 HIV-1. Thus the effect of Dlg1 on virus infectivity takes place at early steps of the virus life cycle, either entry or reverse transcription.

Cholesterol plays a key role in the HIV-1 life cycle; it was shown that viral infectivity correlates with viral cholesterol content and that virus-cell fusion capacity was directly linked with viral cholesterol [41]. Since Dlg1 coordinates the aggregation of lipids rafts during IS formation [24], the cholesterol content of viral particles produced by Dlg1 + and Dlg1- cells was examined. The

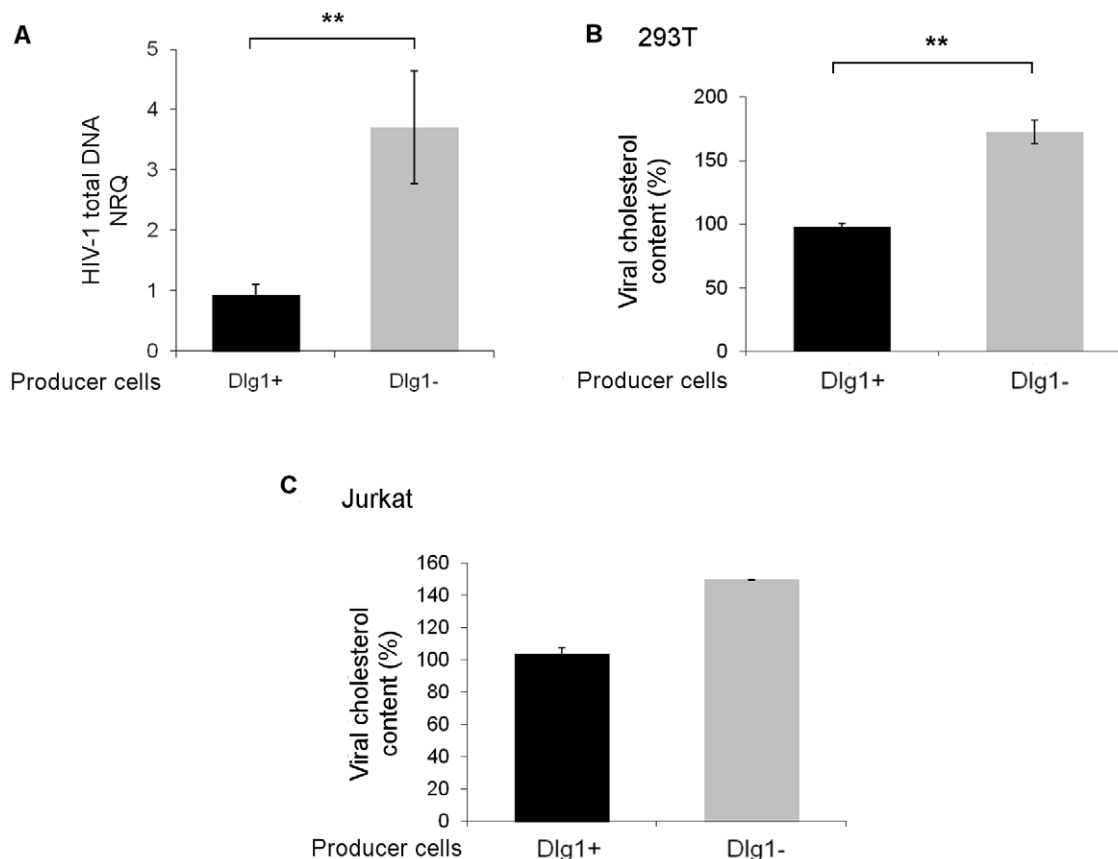


Figure 6. HIV-1 particles produced by Dlg1-depleted cells accumulated higher total HIV-1 DNA amounts during the first hours of infection and have increased cholesterol content. A. Quantification of total viral DNA. Total viral DNA was quantified by quantitative PCR in Jurkat T cells 6 h after infection with NL4.3 or LAI.2 HIV-1 particles produced by Dlg1+ and Dlg1- cells. The results are expressed as mean NRQ (normalized RQ described in materials and methods). Values are from one representative experiment performed in triplicate for infection and in triplicate for qPCR. $P=0.001$. **B. Viral cholesterol content of HIV-1 particles produced by 293T cells.** Dlg1- 293T cells were obtained by siRNA transfection. The cholesterol content of LAI.2 HIV-1 produced by Dlg1+ or Dlg1- 293T cells was determined. The data are the means of three independent experiments performed in duplicate. For each experiment the values were normalized to the value obtained with one of the duplicates of viruses from Dlg1+ cells taken as 100%. $P=0.0026$. **C. Viral cholesterol content of HIV-1 particles produced by Jurkat T cells.** Cholesterol content of LAI.2 HIV-1 produced by Dlg1+ or Dlg1- Jurkat T cells was determined. The data are the means of one experiment performed in duplicate. The values were normalized to the value obtained for one of the duplicates of viruses from Dlg1+ cells taken as 100%. Error bars represent SEM. **, $P<0.01$.

doi:10.1371/journal.pone.0030130.g006

average cholesterol content of LAI.2 HIV-1 particles produced by 293T cells depleted of Dlg1 was increased 1.7 fold compared to the cholesterol content of particles produced by control Dlg1+ cells (Figure 6B). This increase was in excellent correlation with the enhancement of infectivity of 1.8 fold observed for these particles. Similarly, the cholesterol content of the viruses produced by LAI.2 HIV-1 infected Dlg1- Jurkat T cells showing a 1.5 fold increased infectivity was increased 1.5 fold compared to the cholesterol content of the viruses produced by Dlg1+ cells (Figure 6C). These results show a robust correlation between the increase in cholesterol levels of HIV-1 particles produced by Dlg1- cells and their increased infectivity.

In conclusion, the increased accumulation of total viral DNA a few hours after infection with particles produced by Dlg1- cells, together with the increased cholesterol content of these particles and the fact that viral cholesterol content has been reported to determine fusion capacity of HIV-1 [41], are good indications that the effect of Dlg1 on HIV-1 infectivity is probably at the step of virus-cell fusion.

Discussion

Dlg1 organizes signaling complexes at cellular contacts and particularly in T cells at the IS, where it is involved in the assembly and localization of TCR proximal signaling molecules and in the link between the TCR signaling machinery and regulators of the cytoskeleton [20,23,24]. The possible implication of Dlg1 in the VS had not been studied previously. We show here by IF and confocal microscopy studies that Dlg1 is involved in IS formation, but its depletion in T cells does not prevent conjugate formation or HIV-1-induced formation of both monosynapses and polysynapses. In addition, co-culture studies show that Dlg1 does not affect HIV-1 cell-to-cell transfer or effective virus transmission in T cells. Taken together, our results show that despite its key role in IS formation and T cell signaling, Dlg1 is dispensable for HIV-1 induced VS formation in T cells. The different role of Dlg1 in the IS and the VS, is consistent with the recent conclusion that while HIV-1 uses common structural components of the IS to form the VS, the latter has different morphological features, dynamics, intracellular signaling events and cytoskeleton reorganization [42].

Dlg1 is the only protein of the MAGUK family that has been identified and extensively studied in T cells [34] and the shRNAs used here specifically target Dlg1 but not the other proteins of the family. Therefore, it cannot be excluded that other proteins of this family could be present in T cells and compensate for the lack of Dlg1. We provide evidence that in stably depleted Dlg1 T cells the infectivity of the viral particles produced is enhanced. Since specific knockdown of Dlg1 is sufficient to affect HIV-1 particle infectivity, this indicates that in T cells Dlg1 is the main protein of the Dlg family involved in modulation of HIV-1 infectivity.

Our results show that HIV-1 infection of Dlg1- Jurkat T cells results in progeny viruses with enhanced infectivity and that in these cells the early steps of the HIV-1 life cycle are not affected. The absence of correlation between the level of virus-associated Env and the increase in virus infectivity observed in the present study is in contrast with our previous report [18]. The reason for this discrepancy is unknown; it may be attributable to differences between stable and transient depletion, transfection and infection or to cell type-specific differences. In our previous studies, biochemical analyses were performed in readily transfected 293T cells, rather than in T cells that are targets for productive HIV-1 infection as used in the present study. The absence of correlation between the level of virus-associated Env and the increase in virus infectivity is in agreement with a report where

HIV-1 infectivity was not modified by a threefold increase in virus-associated Env content [43]. In addition, it was observed for *Simian immunodeficiency virus* (SIV) that a fiftyfold increase in virus-associated Env content only increased infectivity to two to threefold [44]. It was proposed that the effects of virus-associated Env content on infectivity are likely to depend on the SIV strain, the cell line and the co-receptor used [44].

Here we present viral-containing internal compartments in acutely HIV-1-infected Dlg1- Jurkat T cells. These exciting results open the way for the determination of the nature of these internal compartments as well as for the elucidation of their role in HIV-1 trafficking in T cells. Are these compartments late endosomes/multivesicular bodies as described in macrophages [45,46,47] and in chronically infected T cells [48] or are they invaginations of the plasma membrane as proposed for macrophages [49,50]? What is the kinetics of formation of these compartments? Viral particles budding into these compartments were observed, indicating that at least some of these compartments are sites of particle assembly. Are these sites where more efficient assembly of virus particles occurs? It will be interesting to compare the infectivity, protein composition and cholesterol content of viral particles from the internal compartments to those from the supernatant of cell cultures at different times during infection, in order to elucidate the role of the internal compartments in the assembly of infectious HIV-1 virions.

The lipids of enveloped viruses play a key role in viral morphogenesis and infectivity and many viruses modify host cholesterol metabolism to optimize their replication. Increased infectivity of viral particles produced by Dlg1- T cells may result from different compositions of lipids of the host membrane microdomains from which virus budding occurs. Dlg1 coordinates synaptic lipid raft clustering during IS formation [24] and as a scaffold protein, it may alter the composition of lipids or proteins of the membranes where HIV-1 buds, acting on their incorporation into viral particles. HIV-1 buds from cholesterol rich membrane microdomains [51]. The overall lipid composition of HIV-1 resembles detergent-resistant membrane microdomains [52]. In addition, HIV-1 Nef enhanced the cholesterol content of HIV-1 progeny virions and increased their infectivity, while inhibiting the activity of the major cellular cholesterol transporter, the ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) [53]. Interestingly, it was reported that Dlg1 interacts with ABCA1 [54]. Reduced HIV-1 fusion activity was directly linked to reduced viral cholesterol content [41]. The Membrane Proximal External Region (MPER) preceding the transmembrane domain of the HIV-1 gp41 subunit was shown to be required for fusion activity by destabilizing the viral envelope and MPER fusogenic activity is enhanced by cholesterol [55,56]. In this context, our results of increased infectivity and increased cholesterol content of HIV-1 particles produced by Dlg1- cells, together with increased accumulation of total viral DNA a few hours after infection of T cells with particles produced by Dlg1- cells, indicate that the effect of Dlg1 on HIV-1 infectivity is probably at the step of virus-cell fusion. To test this hypothesis, numerous experiments were performed with pseudotyped viruses as well as using the fluorescence resonance energy transfer-based HIV-1 virion fusion assay [57]. In all experiments using these systems to produce viruses in 293T cells depleted of Dlg1, the virions produced were less infectious than the control ones produced by Dlg1+ cells (data not shown). This phenotype is the opposite of the one obtained with wild type HIV-1 and underlines the important role of Dlg1 in the production of infectious particles.

Alternatively, increased infectivity may result from the activity of host factor(s) differentially incorporated into viral particles in the

presence or absence of Dlgl. Dlgl is not incorporated into viral particles [18] and it has not been reported in proteomic studies of HIV-1 [58,59],[60]. The HIV-1 proteome analyses have identified a vast number of host proteins incorporated into virions (<http://web.ncicrf.gov/research/avp/>). In this list are included the cell surface receptor cluster of differentiation 2 (CD2) and Lck, two cell proteins with which Dlgl interacts. CD2 was found differentially incorporated in virus from sooty mangabeys but not from rhesus macaques infected by SIV [61]. CD2 will be tested in future studies for its possible differential incorporation into HIV-1 particles produced by Dlgl+ and Dlgl- T cells that could affect HIV-1 binding to target cells. Proteomic and lipidomic analyses of highly purified HIV-1 particles produced by Dlgl+ and Dlgl- T cells are needed to determine the nature of the factor(s) increasing infectivity of particles produced in the absence of Dlgl.

Increased infectivity of the virus produced by Dlgl- cells does not result in increased cell-to-cell HIV-1 transmission in these cells, indicating that cell-to-cell HIV-1 transmission in co-culture can overcome barriers that efficiently limit cell-free transmission. Compared to viruses produced by Dlgl- cells, viruses produced by cells expressing endogenous Dlgl may have either reduced stability, reduced affinity for target cells or may be less efficient in fusion and replication. We proposed that by controlling the cholesterol content of HIV-1 particles, Dlgl may regulate the fusion capacity of the particles, and that when these viruses are shed at high concentrations into the cleft of the VS directly next to the target cell, multiple viruses may enter the target cell, overcoming the reduced fusion capacity of individual particles. That multiple copies of HIV-1 can be co-transmitted across a single VS and infect a target cell was recently demonstrated [62].

In conclusion, we demonstrate for the first time that despite the key role of the scaffolding protein Dlgl in the IS formation and T

cell signaling, Dlgl does not affect the VS formation or cell-to-cell spread of HIV-1. We further demonstrate that Dlgl plays a role in HIV-1 cell-free virus transmission and postulate that by modifying viral cholesterol content Dlgl affects the step of virus-cell fusion. Our studies will have important implications for understanding how Jurkat and CD4+ primary T cells can rescue the deficiencies of cell-free virus by cell-to-cell transmission. Further insights into the role of Dlgl on lipids or other host factors incorporation into HIV-1 may provide new ideas on the relationship between structure and function of infectious viral particles.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Eric Freed for materials and for critical reading of the manuscript, Dr. Morgan Bomsel, Dr. Agnes Fouet and Dr. Harry Taylor for helpful discussions, Dr. Anne-Lise Haenni for critical reading of the manuscript, Dr. Stephane Emiliani, members of his group and members of the Genomic and transcriptomic facility of the Cochin Institute for help with the quantitative PCR, Dr. Cloé Paul-Victor for help with the statistical analyses, and members of the Cellular Imaging and of the Flow Cytometry facilities of the Cochin Institute for their help. We thank the AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIAID, NIH, for the following reagents that were obtained through the program: 1G5 cells from Dr. Estuardo Aguilar-Cordova and Dr. John Belmont; HIV-1LAI (BRU) V3 monoclonal Antibody (5F7) from Dr. Albrecht von Brunn; HIV-1 SFE p24 Antiserum and CXCR4 Monoclonal Antibody (12G5) from Dr. James Hoxie and HIV-1 anti-p24 mAb (#24-2).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: PN CR CP BCR. Performed the experiments: PN MC CG AS JMM BCR. Analyzed the data: PN MC CG CR CP BCR. Contributed reagents/materials/analysis tools: CR. Wrote the paper: PN CP BCR.

References

- Chen P, Hubner W, Spinelli MA, Chen BK (2007) Predominant mode of human immunodeficiency virus transfer between T cells is mediated by sustained Env-dependent neutralization-resistant virological synapses. *J Virol* 81: 12582–12595.
- Sourisseau M, Sol-Foulon N, Porrot F, Blanchet F, Schwartz O (2007) Inefficient human immunodeficiency virus replication in mobile lymphocytes. *J Virol* 81: 1000–1012.
- Blanco J, Bosch B, Fernandez-Figueras MT, Barretina J, Clotet B, et al. (2004) High level of coreceptor-independent HIV transfer induced by contacts between primary CD4 T cells. *J Biol Chem* 279: 51305–51314.
- Dimitrov DS, Willey RL, Sato H, Chang LJ, Blumenthal R, et al. (1993) Quantitation of human immunodeficiency virus type 1 infection kinetics. *J Virol* 67: 2182–2190.
- Sowinski S, Jolly C, Berninghausen O, Purbhoo MA, Chauveau A, et al. (2008) Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nat Cell Biol* 10: 211–219.
- Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Horensavitz C, Pypaert M, et al. (2007) Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission. *Nat Cell Biol* 9: 310–315.
- Jolly C, Kashefi K, Hollinshead M, Sattentau QJ (2004) HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse. *J Exp Med* 199: 283–293.
- Jolly C, Sattentau QJ (2004) Retroviral spread by induction of virological synapses. *Traffic* 5: 643–650.
- Alfsen A, Yu H, Magerus-Chatinet A, Schmitt A, Bomsel M (2005) HIV-1-infected blood mononuclear cells form an integrin- and agrin-dependent viral synapse to induce efficient HIV-1 transcytosis across epithelial cell monolayer. *Mol Biol Cell* 16: 4267–4279.
- Igakura T, Stinchcombe JC, Goon PK, Taylor GP, Weber JN, et al. (2003) Spread of HTLV-I between lymphocytes by virus-induced polarization of the cytoskeleton. *Science* 299: 1713–1716.
- McDonald D, Wu L, Bohks SM, KewalRamani VN, Unutmaz D, et al. (2003) Recruitment of HIV and its receptors to dendritic cell-T cell junctions. *Science* 300: 1295–1297.
- Mothes W, Sherer NM, Jin J, Zhong P (2010) Virus cell-to-cell transmission. *J Virol* 84: 8360–8368.
- Sattentau Q (2008) Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol* 6: 815–826.
- Thoulouze MI, Sol-Foulon N, Blanchet F, Dautry-Varsat A, Schwartz O, et al. (2006) Human immunodeficiency virus type-1 infection impairs the formation of the immunological synapse. *Immunity* 24: 547–561.
- Freed EO, Mouland AJ (2006) The cell biology of HIV-1 and other retroviruses. *Retrovirology* 3: 77.
- Fujii K, Hurley JH, Freed EO (2007) Beyond Tsg101: the role of Alix in 'ESCRTing' HIV-1. *Nat Rev Microbiol* 5: 912–916.
- Fujii K, Munshi UM, Ablan SD, Demirov DG, Soheilian F, et al. (2009) Functional role of Alix in HIV-1 replication. *Virology* 391: 284–292.
- Perugi F, Muriaux D, Ramirez BC, Chabani S, Decroly E, et al. (2009) Human Discs Large is a new negative regulator of human immunodeficiency virus-1 infectivity. *Mol Biol Cell* 20: 498–508.
- Krummel MF, Macara I (2006) Maintenance and modulation of T cell polarity. *Nat Immunol* 7: 1143–1149.
- Ludford-Menting MJ, Oliaro J, Sacirbegovic F, Cheah ET, Pedersen N, et al. (2005) A network of PDZ-containing proteins regulates T cell polarity and morphology during migration and immunological synapse formation. *Immunity* 22: 737–748.
- Xavier R, Rabizadeh S, Ishiguro K, Andre N, Ortiz JB, et al. (2004) Discs large (Dlgl) complexes in lymphocyte activation. *J Cell Biol* 166: 173–178.
- Hanada T, Lin L, Chandy KG, Oh SS, Chishiti AH (1997) Human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor binds to p56lck tyrosine kinase and Shaker type Kv1.3 potassium channel in T lymphocytes. *J Biol Chem* 272: 26899–26904.
- Shaw AS, Filbert EL (2009) Scaffold proteins and immune-cell signalling. *Nat Rev Immunol* 9: 47–56.
- Round JL, Tomassian T, Zhang M, Patel V, Schoenberger SP, et al. (2005) Dlgh1 coordinates actin polymerization, synaptic T cell receptor and lipid raft aggregation, and effector function in T cells. *J Exp Med* 201: 419–430.
- Lasserre R, Charrin S, Cuche C, Danckaert A, Thoulouze MI, et al. (2010) Ezrin tunes T-cell activation by controlling Dlgl and microtubule positioning at the immunological synapse. *EMBO J* 29: 2301–2314.
- Ilani T, Khanna C, Zhou M, Veenstra TD, Bretscher A (2007) Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin. *J Cell Biol* 179: 733–746.
- Blanchard N, Di Bartolo V, Hivroz C (2002) In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17: 389–399.

28. Sol-Foulon N, Sourisseau M, Porrot F, Thoulouze MI, Trouillet C, et al. (2007) ZAP-70 kinase regulates HIV cell-to-cell spread and virological synapse formation. *EMBO J* 26: 516–526.
29. von Brunn A, Brand M, Reichhuber C, Morys-Wortmann C, Deinhardt F, et al. (1993) Principal neutralizing domain of HIV-1 is highly immunogenic when expressed on the surface of hepatitis B core particles. *Vaccine* 11: 817–824.
30. Endres MJ, Clapham PR, Marsh M, Ahuja M, Turner JD, et al. (1996) CD4-independent infection by HIV-2 is mediated by fusin/CXCR4. *Cell* 87: 745–756.
31. Kiernan RE, Ono A, Englund G, Freed EO (1998) Role of matrix in an early postentry step in the human immunodeficiency virus type 1 life cycle. *J Virol* 72: 4116–4126.
32. Murakami T, Freed EO (2000) The long cytoplasmic tail of gp41 is required in a cell type-dependent manner for HIV-1 envelope glycoprotein incorporation into virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 343–348.
33. Blot V, Delamarre L, Perugi F, Pham D, Benichou S, et al. (2004) Human Dlg protein binds to the envelope glycoproteins of human T-cell leukemia virus type 1 and regulates envelope mediated cell-cell fusion in T lymphocytes. *J Cell Sci* 117: 3983–3993.
34. Funke L, Dakoji S, Bredt DS (2005) Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu Rev Biochem* 74: 219–245.
35. Brussel A, Sonigo P (2004) Evidence for gene expression by unintegrated human immunodeficiency virus type 1 DNA species. *J Virol* 78: 11263–11271.
36. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
37. Martin-Cofreces NB, Robles-Valero J, Cabrero JR, Mittelbrunn M, Gordon-Alonso M, et al. (2008) MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol* 182: 951–962.
38. Stinchcombe JC, Majorovits E, Bossi G, Fuller S, Griffiths GM (2006) Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443: 462–465.
39. Jolly C, Booth NJ, Neil SJ (2010) Cell-cell spread of human immunodeficiency virus type 1 overcomes tetherin/BST-2-mediated restriction in T cells. *J Virol* 84: 12185–12199.
40. Jolly C, Mitar I, Sattentau QJ (2007) Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 81: 5547–5560.
41. Morrow MP, Grant A, Mujawar Z, Dubrovsky L, Pushkarsky T, et al. (2010) Stimulation of the liver X receptor pathway inhibits HIV-1 replication via induction of ATP-binding cassette transporter A1. *Mol Pharmacol* 78: 215–225.
42. Vasiliver-Shamis G, Dustin ML, Hioe CE (2010) HIV-1 Virological Synapse is not Simply a Copycat of the Immunological Synapse. *Viruses* 2: 1239–1260.
43. Lopez-Verges S, Camus G, Blot G, Beauvoir R, Benarous R, et al. (2006) Tail-interacting protein TIP47 is a connector between Gag and Env and is required for Env incorporation into HIV-1 virions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14947–14952.
44. Yuste E, Reeves JD, Doms RW, Desrosiers RC (2004) Modulation of Env content in virions of simian immunodeficiency virus: correlation with cell surface expression and virion infectivity. *J Virol* 78: 6775–6785.
45. Nydegger S, Foti M, Derdowski A, Spearman P, Thali M (2003) HIV-1 egress is gated through late endosomal membranes. *Traffic* 4: 902–910.
46. Ono A, Freed EO (2004) Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body. *J Virol* 78: 1552–1563.
47. Sherer NM, Lehmann MJ, Jimenez-Soto LF, Ingmundson A, Horner SM, et al. (2003) Visualization of retroviral replication in living cells reveals budding into multivesicular bodies. *Traffic* 4: 785–801.
48. Grigorov B, Arcanger F, Roingeard P, Darlix JL, Muriaux D (2006) Assembly of infectious HIV-1 in human epithelial and T-lymphoblastic cell lines. *J Mol Biol* 359: 848–862.
49. Deneka M, Pelchen-Matthews A, Byland R, Ruiz-Mateos E, Marsh M (2007) In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53. *J Cell Biol* 177: 329–341.
50. Welsch S, Keppler OT, Habermann A, Allespach I, Krijnse-Locker J, et al. (2007) HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages. *PLoS Pathog* 3: e36.
51. Ono A, Freed EO (2001) Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13925–13930.
52. Brugger B, Glass B, Haberkant P, Leibrecht I, Wieland FT, et al. (2006) The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2641–2646.
53. Mujawar Z, Rose H, Morrow MP, Pushkarsky T, Dubrovsky L, et al. (2006) Human immunodeficiency virus impairs reverse cholesterol transport from macrophages. *PLoS Biol* 4: e365.
54. Fitzgerald ML, Okuhira K, Short GF 3rd, Manning JJ, Bell SA, et al. (2004) ATP-binding cassette transporter A1 contains a novel C-terminal VFNFA motif that is required for its cholesterol efflux and ApoA-I binding activities. *J Biol Chem* 279: 48477–48485.
55. Saez-Cirion A, Nir S, Lorizate M, Agirre A, Cruz A, et al. (2002) Sphingomyelin and cholesterol promote HIV-1 gp41 pretransmembrane sequence surface aggregation and membrane restructuring. *J Biol Chem* 277: 21776–21785.
56. Nieva JL, Apellaniz B, Huarte N, Lorizate M (2011) A new paradigm in molecular recognition? Specific antibody binding to membrane-inserted HIV-1 epitopes. *J Mol Recognit* 24: 642–646.
57. Cavois M, De Noronha C, Greene WC (2002) A sensitive and specific enzyme-based assay detecting HIV-1 virion fusion in primary T lymphocytes. *Nat Biotechnol* 20: 1151–1154.
58. Booth AM, Fang Y, Fallon JK, Yang JM, Hildreth JE, et al. (2006) Exosomes and HIV Gag bud from endosome-like domains of the T cell plasma membrane. *J Cell Biol* 172: 923–935.
59. Chertova E, Chertov O, Coren LV, Roser JD, Trubey CM, et al. (2006) Proteomic and biochemical analysis of purified human immunodeficiency virus type 1 produced from infected monocyte-derived macrophages. *J Virol* 80: 9039–9052.
60. Ott DE (2008) Cellular proteins detected in HIV-1. *Rev Med Virol* 18: 159–175.
61. Stephenson ST, Bostik P, Song B, Rajan D, Bhimani S, et al. (2010) Distinct host cell proteins incorporated by SIV replicating in CD4+ T cells from natural disease resistant versus non-natural disease susceptible hosts. *Retrovirology* 7: 107.
62. Del Portillo A, Tripodi J, Najfeld V, Wodarz D, Levy DN, et al. (2011) Multiploid Inheritance of HIV-1 during Cell-to-Cell Infection. *J Virol* 85: 7169–7176.

Lors d'une réponse immune, les lymphocytes T et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) interagissent entre elles. La synapse immunologique (SI), interface de contact entre les deux cellules, est le site où une cascade de signalisation se met en place. Les lymphocytes T subissent alors un profond réarrangement au niveau de la membrane plasmique et du cytoplasme : les protéines impliquées dans cette signalisation sont alors recrutées à la synapse immunologique.

Nous nous intéressons à une nouvelle structure appelée "l'antisynapse" qui se localise au pôle opposé à celui de la synapse immunologique. L'objectif de notre étude est de déterminer la composition de cette nouvelle structure et sa cinétique d'apparition et de disparition.

Afin d'étudier cette structure, nous faisons des conjugués *in vitro* entre des CPA et des lymphocytes T et nous observons la formation de ces contacts sur cellules vivantes ou cellules fixés. L'antisynapse est composée de molécules de signalisations que l'on retrouve classiquement à la synapse immunologique, tels que LAT, CD3, Lck ou la PI3K. Grâce à la sonde fluorescente ROZA récemment développée au laboratoire, nous avons montré que la kinase ZAP-70 est activée à l'antisynapse. Ces observations sont cohérentes avec le fait que nous avons déjà observé la présence de protéines avec des tyrosines phosphorylées à ce pôle. Cette structure précoce et transitoire s'observe fréquemment et apparaît très souvent avant que la synapse ne puisse être détectée. Son apparition est indépendante de la signalisation en aval du TCR et peut être déclenchée par un signal d'adhésion. D'autre part, le cytosquelette de microtubules semble jouer un rôle majeur dans sa disparition.

Le rôle de l'antisynapse est toujours en cours d'étude mais nous avons déjà pu montrer qu'elle constituait un point de stockage pour les protéines destinées à former la synapse immunologique au moment de sa formation.

Grâce à cette structure nous essayons de mieux comprendre comment le signalosome s'assemble dans la cellule T. Nous voulons également comprendre comment une telle structure peut apparaître aussi rapidement et quelles sont les voies de signalisation mises en jeu dans sa formation.

ABSTRACT

During the immune response, T lymphocytes and antigen presenting cells (APC) are known to develop strong interactions. The immunological synapse (IS), structure established at the interface between the two cells, is the site where a cascade of signaling events is initiated and may lead to a physiological response. T lymphocyte undergoes a profound rearrangement in the plasma membrane and in the cytoplasm: proteins which are involved in the signaling are recruited to the immunological synapse.

We have recently described a new structure that we have called antisynapse (ASI), located at the cell pole opposite to the synapse. The purpose of this work is to characterize the components of this new structure and their kinetic of appearance and disappearance.

To study this structure, we made *in vitro* contact between APC and T lymphocytes and we observed these conjugates either in live or fixed conditions.

Surprisingly, the antisynapse contains most of the signaling molecules classically reported as components of the immunological synapse such as LAT, CD3, Lck or PI3K. By using the fluorescent probe ROZA that we recently developed, we have shown that ZAP-70 is activated at the antisynapse. This observation is consistent with the fact that we have also observed the presence of tyrosine-phosphorylated proteins at the ASI. Interestingly, we have observed that LFA-1, a protein involved in the adherence, is also found at the ASI.

Our results indicate that this transient structure develops frequently and appears rapidly after the contact between the T cell (around one minute) and the APC. Surprisingly, antisynapse formation is independent on TCR signaling but is triggered by adhesion. Furthermore, it disappears using the microtubule network.

The role of the antisynapse is currently under investigation but we have shown that it constitutes a stock of proteins ready to go to the forming immune synapse.

We currently try to take advantage of this structure to better understand how the T cell signalosome may assemble and to find out if, functionally, the T cell takes advantage of this structure. We also try to understand how this paradoxical structure can appear so rapidly and what are the signaling pathways involved in its establishment.